F 1330
68
R-S-J8

studii şi cercetări de biochimie

1

TOMUL 19

1976

IANUARIE — IUNIE

EDITURA ACADEMIEI REPUBLICII SOCIALISTE ROMÂNIA

St. cerc. biochim., tomul 19, nr. 1, p. 1–128, 1976, Bucureşti

SCBIAS — 19 (1), 1–128 (1976)

COMITETUL DE REDACȚIE

Redactor responsabil:

Academician E. MACOVSCHI

Redactor responsabil adjunct:

H. SLUȘANSCHI

Membri:

S. OERIU, membru corespondent al Academiei Republicii Socialiste România; EUGENIA SORU, membru corespondent al Academiei Republicii Socialiste România; M. MEZINCESCU; I. VASILESCU; TR. RĂDULESCU; VICTORIA ALEXANDRESCU

Secretar de redacție:

CECILIA MOTAȘ

Revista apare de 2 ori pe an.

Prețul unui abonament anual este de 40 lei.

În țară abonamentele se fac la oficiile poștale, agențiile poștale, factorii poștali și difuzorii voluntari din întreprinderi și instituții. Revista se poate procura (direct sau prin poștă) și prin PUNCTUL DE DESFACERE din cadrul Editurii Academiei.

Cititorii din străinătate se pot abona prin ILEXIM serviciul export-import presă—Calea Griviței nr. 64—66, P.O.B. 2001, telex 011226—București

Manualele, cărțile și revistele pentru schimb, precum și orice corespondență, se vor trimite pe adresa Comitetului de redacție al revistei „Studii și cercetări de biochimie", București, Str. Docenților, nr. 20, sectorul 1.

EDITURA ACADEMIEI REPUBLICII SOCIALISTE ROMÂNIA

București, Calea Victoriei 125, sectorul 1

STUDII ŞI CERCETĂRI DE

B I O C H I M I E

Tomul 19, nr. 1 1976

IANUARIE—IUNIE

ORSZÁGOS MŰSZAKI KÖNYVTÁR ÉS DOKUMENTÁCIÓS KÖZPONT 1883

SUMAR

V. ALEXANDRESCU, F. MIHĂILESCU, I. HAGIMA, D. POPOV, Dinamica activităţii unor enzime în sucurile stoarse din mere şi pere păstrate la temperatura de 23°C în perioada de la maturarea fiziologică la cea de supramaturare 5

L. BOGHIANU, Efectul administrării metil -mercurului asupra activităţii unor enzime implicate în metabolismul glucidic 13

L. BOTOŞENEANU, S. VASU, Ribonucleazele din plantulele de mazăre (*Pisum sativum*) crescute la întuneric şi în regim de lumină-întuneric 19

L.M. BURUIANĂ, D. M. MIHAI, D. CURCĂ, Noi observaţii asupra modificărilor biochimice din carnea porcilor cu miopatie exudativă 25

M. DUMITRESCU, H.D. SCHELL, M.A. MATEESCU, Repartiţia peroxidazei în diferite organe ale plantei de tutun (*Nicotiana tabacum* L.) şi purificarea ei din măduva tulpinii 33

A. GHEORGHIU, E. IONESCU-MATIU, I. CĂRĂUŞU, Contribuţii la valorificarea agarului din alga *Ceramium rubrum* (Huds.) Ag. de pe litoralul românesc al mării Negre 39

E. ILICA, Evidenţierea şi purificarea parţială a unor exoglicozidaze (β-galactozidaza, β-glucozidaza, β-N-acetilglucozaminidaza şi α-manozidaza) din *Phaseolus vulgaris*. 43

Ş. MARCOVSKI, D. CRIŞAN, S. COMOROŞAN, Efectul iradierii mitomicinei-C şi 6-mercaptopurinei asupra creşterii unei tulpini de *E. coli* 49

C. MIHAI, Activitatea ATP-azei mitocondriale în condiţiile radiosensibilizării chimice 55

N. MOLDOVEANU, Purificarea piruvatkinazei din muşchi de şobolan şi cinetica de reacţie în prezenţa ATP şi CP 61

T. MUREŞAN, D. POPOV, I. HAGIMA, M. ŞERBAN, Cercetări biochimice comparative asupra unor populaţii, soiuri şi linii de *Phaseolus vulgaris*. III. Formele moleculare multiple ale peroxidazei şi catalazei 69

M. ŞERBAN, D. POPOV, T. MUREŞAN, Cercetări biochimice comparative asupra unor populaţii, soiuri şi linii de *Phaseolus vulgaris*. IV. Polimorfismul molecular al proteinelor solubile 75

G. NEAMŢU, T. LÁSZLO, C. BILAUS, GH. ILLYES, Cercetări carotenotaxonomice la plante superioare. VIII. Pigmenţi carotenoidici şi clorofilieni din unele plante leguminoase 81

D. ONICĂ, C. MEDEŞAN, M. LAKY, Izolarea unui component cu afinitate pentru IgG de pe membrana macrofagelor alveolare de iepure 87

TR. RĂDULESCU, TR. BENŢIA, Efectul anesteziei asupra concentraţiei sodiului şi potasiului din muşchiul gastrocnemian de broască 95

H.D. SCHELL, M. CÂRSTEANU, A. NASTA, I. CORNOIU, O. GOZIA, TR. BENȚIA, Influența nutriției minerale asupra conținutului în alcaloizi tropanici din *Datura innoxia* 101

H.D. SCHELL, I. CORNOIU, TR. BENȚIA, Conjugatele miozinei cu CH- și AH-Sepharose 4 B. 109

M. TĂMAȘ, S. STOLERIU, Identificarea cromatografică a antocianidinelor și antocianozidelor din florile și fructele unor plante indigene. 113

V. TĂMAȘ, T. PERJU, Carotinoidele din insecte. I. Cerotinoide din ouă, larve, elitre și insecte adulte *Crioceris duodecempunctata* L. 121

NOTĂ DE LABORATOR

Á. KOVÁTS, B. BÖHM, Contribuții la determinarea cadmiului din urină prin metoda spectrofotometrică de absorbție atomică, cu atomizare în cuptor de grafit 125

STUDII ŞI CERCETĂRI DE

B I O C H I M I E

Tomul 19, nº 1 1976

JANUARY—JUNE

CONTENTS

V. ALEXANDRESCU, F. MIHĂILESCU, I. HAGIMA, D. POPOV, The dynamics of some enzymes activity in saps squeezed out of apples and pears stored at 23°C between the physiological maturation and the overripening 5

L. BOGHIANU, Effect of methyl-hydrargirum administration on the activity of certain enzymes involved in carbohydrate metabolism 13

L. BOTOŞENEANU, S. VASU, Ribonucleases in pea (*Pisum sativum*) seedlings grown in the dark and in the light-dark regimes 19

L.M. BURUIANĂ, D. M. MIHAI, D. CURCĂ, Further observations on the biochemical modifications in the exudative myopathy of swine 25

M. DUMITRESCU, H.D. SCHELL, M.A. MATEESCU, Peroxidase distribution in different organs of *Nicotiana tabacum* L. and its purification from the stem pith 33

A. GHEORGHIU, E. IONESCU-MATIU, T. CĂRĂUŞU, Contributions to the valorization of agar from alga *Ceramium rubrum* (Huds.) Ag. growing on the Romanian beach of the Black Sea 39

E. ILICA, The relevation and partial purification of certain exoglycosidases (β-galactosidase, β-glucosidase, β-N-acetylglucosaminidase and α-mannosidase) from *Phaseolus vulgaris*. 43

S. MARCOVSKI, D. CRIŞAN, S. COMOROŞAN, Effect of mitomycin-C and 6-mercaptopurine irradiation upon the growth of *E. coli* B strain. . . . 49

C. MIHAI, Mitochondrial ATP-ase activity in the conditions of radiosensitization with drugs 55

N. MOLDOVEANU, The purification of pyruvate kinase from rat muscle and the kinetic reaction in the presence of ATP and CP 61

T. MUREŞAN, D. POPOV, I. HAGIMA, M. ŞERBAN, Comparative biochemical studies on populations, inbreds and lines of *Phaseolus vulgaris*. III. Multiple molecular forms of catalase and peroxidase 69

M. ŞERBAN, D. POPOV, T. MUREŞAN, Comparative biochemical studies on populations, inbreds and lines of *Phaseolus vulgaris*. IV. Molecular polymorphism of soluble proteins 75

G. NEAMŢU, T. LÁSZLO, C. BILAUS, GH. ILLYES, Carotenotaxonomic investigations in higher plants. VIII. Carotenoid and chlorophyll pigments of some leguminous plants 81

D. ONICĂ, C. MEDEŞAN, M. LAKY, Isolation of a component with affinity for IgG from the rabbit alveolar macrophage membrane 87

TR. RĂDULESCU, TR. BENŢIA, Effect of anesthesia on sodium and kalium concentrations in frog gastrocnemius muscle 95

St. cerc. biochim., tomul 19, *1*, p. 1—128, Bucureşti, 1976

H.D. SCHELL, M. CÂRSTEANU, A. NASTA, I. CORNOIU, O. GOZIA, TR. BENȚIA, The influence of mineral nutrition on the amount of tropane alkaloids in *Datura innoxia* 101

H.D. SCHELL, I. CORNOIU, TR. BENTIA, Myosine conjugates with OH- and AH-Sepharose 4 B. 109

M. TĂMAȘ, S. STOLERIU, Chromatographic identification of anthocyanidins and anthocyanosides in some flowers and fruits of indigenous plants 113

V. TĂMAȘ, T. PERJU, Insect carotenoids. I. Carotenoids from eggs, larvae, elitra and beetles of *Crioceris duodecempunctata* 121

LAEORATORY NOTE

Á. KOVÁTS, R. BÖHM, Contribution to the urinary cadmium determination by flameless atomic absorption spectrophotometry with atomization in graphite furnace. 125

ST. CERC. BIOCHIM., 19, 1, 5–11 (1976)

DINAMICA ACTIVITĂȚII UNOR ENZIME ÎN SUCURILE STOARSE DIN MERE ȘI PERE PĂSTRATE LA TEMPERATURA DE 23° C ÎN PERIOADA DE LA MATURAREA FIZIOLOGICĂ LA CEA DE SUPRAMATURARE

VICTORIA ALEXANDRESCU, FLORIN MIHĂILESCU, IOANA HAGIMA, DOINA POPOV

Rezumat. — La mere maturitatea de consum este marcată prin faptul că activitatea amilolitică suferă o scădere bruscă, după care rămîne la valori constante, iar volumul sucului plasmatic rămîne constant. La pere maturitatea de consum și supramaturitatea sînt marcate prin modificări în evoluția activității catalazei din sucul vacuolar, a activității peroxidazei și polifenoloxidazei din sucul plasmatic, și a activității fosfatazei acide din ambele sucuri; volumul sucului plasmatic rămîne constant. Urmărirea dinamicii sucurilor „vacuolar" și „plasmatic" și a unor componente eliberate odată cu ele, poate fi utilizată pentru demonstrarea și chiar prevederea maturității de consum și a supramaturității (a proceselor de degradare) la fructele depozitate.

Păstrarea fructelor (mere, pere), are loc mai bine la temperaturi joase de +0,5 — +3°C, cînd s-a constatat încetinirea metabolismului glucidelor, acizilor organici, substanțelor pectice, taninurilor etc, fapt ce justifică menținerea un timp de patru ori mai îndelungat a valorii nutritive și a calităților organoleptice ale fructelor (1). Macovschi și Cornoiu (2) au stabilit că în perioada păstrării fructelor începe destrămarea biostructurii iar apa și substanțele hidrosolubile eliberate, se adaugă la apa și la substanțele hidrosolubile libere existente în țesut și pot fi obținute ca „suc vacuolar". Conform teoriei biostructurii (3), (4), prin înghețarea reziduului se va elibera o nouă cantitate de apă și de substanțe hidrosolubile ca „suc plasmatic".

În lucrarea de față ne-am propus să urmărim evoluția activităților unor enzime din sucurile vacuolar și plasmatic din mere și pere în perioada de la maturitatea fiziologică la cea de consum, precum și a modificărilor ce apar odată cu degradarea fructelor. Pentru a cerceta într-un timp scurt aceste procese, am recurs la accelerarea maturității de consum a fructelor prin depozitarea lor timp de 53 zile la temperatura de +23°C. Indicii urmăriți au fost: activitatea peroxidazei, polifenoloxidazei, catalazei, fosfatazei acide și enzimelor amilolitice, precum și cantitatea de fosfați anorganici și substanțe reducătoare.

MATERIAL ȘI METODĂ

S-a lucrat cu mere Jonathan, Parmen auriu și pere Curé*. Experiențele s-au efectuat în 1970. Depozitarea merelor s-a făcut între 22 octombrie și 14 decembrie, într-o încăpere (nișă) în care temperatura medie a fost de +23°C cu oscilații între 21—25°C. Pentru analize, s-au folosit numai fructe sănătoase (1 500—2 000 g) care s-au tăiat în rondele de 1 cm după

* Fructele au provenit din bazinul pomicol Bistrița

îndepărtarea părţii cu sămînţa. Porţiuni de 500g pulpă sănătoasă s-au stors în presa Hafico printr-un strat dublu de ţesătură de nylon la presiunea uleiului asupra tijei pistonului de 200 atm, respectiv la 7 atm, asupra materialului obţinîndu-se sucul vacuolar. Pulpa rămasă după stoarcerea sucului vacuolar (reziduul) s-a îngheţat la —12°C şi după două zile s-a dezgheţat şi s-a stors din nou la presiunea de 200 atm, obţinîndu-se sucul plasmatic. Ambele sucuri s-au centrifugat separat la rece, la 5000 g, timp de 15 min. S-a măsurat volumul sucurilor vacuolar şi plasmatic obţinute şi s-a calculat corespondentul volumului lor pentru 100 g pulpă, la care s-au raportat şi datele experimentale. Determinările s-au efectuat în momentul depozitării fructelor (22 oct.) şi după 18, 32 şi 53 zile de păstrare (9 nov., 23 nov., 14 dec.).

Activitatea peroxidazei şi polifenoloxidazei s-a determinat după metoda lui Mihlin şi Bronovitkaia (5), activitatea catalazei prin metoda manometrică la aparatul Warburg (6), activitatea fosfatazei acide şi cantitatea de fosfaţi anorganici prin metoda Fiske—SubbaRow (7), iar activitatea amilolitică şi cantitatea substanţelor reducătoare după principiul metodei lui Noelting şi Bernfeld (8) cu unele modificări (9). Pentru stabilirea activităţii fosfatazei acide şi a enzimelor amilolitice s-a lucrat cu sucuri dializate faţă de apă distilată, pentru îndepărtarea fosfaţilor anorganici şi a substanţelor reducătoare prezente în ele.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Aspectul fructelor. Fructele puse la păstrare erau maturate din punct de vedere fiziologic (22 oct.). În perioada de depozitare fructele ajung la maturitatea de consum; apoi, îşi pierd valoarea nutritivă şi calităţile organoleptice. Merele Jonathan erau degradate (zbîrcite şi fără gust) după 53 zile, merele Parmen auriu aveau pulpa sfărîmicioasă după 32 zile, iar perele Curé după 32 zile erau deja trecute de perioada optimă de consum, pentru ca după 53 zile să fie făinoase şi fără gust.

Merele Jonathan şi Parmen auriu (*tabela 1 şi 2*). Volumul ambelor sucuri scade în perioada depozitării. Volumul sucului vacuolar scade deoarece, la temperatura de păstrare, viteza de evaporare a apei libere din mere este mare şi depăşeşte viteza de eliberare a ei din structuri. Volumul sucului plasmatic scade deoarece în acest interval o parte din apa structurată s-a eliberat şi s-a adăugat la sucul vacuolar (2). În ultimele două experienţe volumul sucului plasmatic rămîne constant, ceea ce arată că celula şi-a păstrat o cantitate minimă de apă, necesară activităţii ei. În momentul cînd pulpa mărului devine un marc moale, nu se mai pot obţine cele două sucuri, deoarece pulpa trece în întregime prin presă şi rămîne doar tegumentul, cum a fost cazul la merele Parmen auriu după 32 zile de păstrare. Activitatea peroxidazei s-a detectat în ambele sucuri din mere doar cînd acestea au ajuns la maturitatea de consum, pentru ca în perioada de degradare a fructului, activitatea peroxidazei să scadă. Activitatea polifenoloxidazei nu s-a decelat în toată perioada urmărită, iar activitatea catalazei, doar ca urme. Activitatea fosfatazei acide scade continuu în sucul vacuolar, cu excepţia ultimei determinări, după 53 zile de depozitare, cînd merele sînt degradate, sbîrcite şi fără gust, şi creşte continuu în sucul plasmatic al merelor. Este posibil ca acest fenomen să fie datorat fixării sau adsorb-

Tabela 1

Merele Jonathan în perioada de depozitare

Suc		Zile de depozitare							
		0		18		32		53	
		La 1 ml suc	La vol. din 100 g material	La 1 ml suc	La vol. din 100 g material	La 1 ml suc	La vol. din 100 g material	La 1 ml suc	La vol din 100 g material
ml suc la 100 g material	*v*	—	30,75	—	24,00	—	18,60	—	13,33
	p	—	38,50	—	35,50	—	30,00	—	30,67
Activit. peroxidazei ml $I_2N/50$	*v*	0	0	0	0	0,06	1,11	0,01	0,13
	p	0	0	0	0	0,08	2,40	0,04	1,22
Activit. catalazei μl O_2 în 10 min. la 15°C.	*v*	0	0	0	0	0,75	14,00	4,50	63,00
	p	2,00	77,00	0	0	0,50	15,00	1,00	31,00
Activit. fosfatazei acide γP_i	*v*	2,40	73,80	2,30	55,20	1,60	29,80	2,70	36,00
	p	0	0	0,60	21,30	0,80	24,00	1,10	33,70
Cantit. de *P* anorg. liber γP_i	*v*	35,00	1091,00	38,00	912,00	50,00	937,00	57,00	766,00
	p	46,00	1771,00	50,00	1792,00	46,00	1380,00	61,00	1871,00
Activit. enzimelor amilolitice mg maltoză	*v*	0,70	21,50	0,41	9,80	0,47	8,70	0,70	9,30
	p	0,52	20,00	0,36	12,80	0,49	14,70	0,47	12,40
Cantit. subst. red. mg maltoză	*v*	136,00	4182,00	164,00	3936,00	192,00	3571,00	232,00	3092,00
	p	174,00	6699,00	178,00	6327,00	204,00	6120,00	268,00	8209,00

v = vacuolar; *p* = plasmatic.

Pentru determinări s-au folosit următoarele cantităţi de suc; activitatea peroxidazei — 5 ml; activitatea catalazei — 4 ml; activitatea fosfatazei acide — 10 ml; activitatea amilolitică — 1 ml; cantitatea fosfaţilor anorganici liberi — 2 ml; cantitatea substanţelor reducătoare libere — 1 ml suc diluţia 1/200; activitatea polifenoloxidazei nu a fost decelată cu 5 ml suc în reacţie.

ţiei enzimei solubile din sucul vacuolar pe structurile intracelulare în timpul procesului de maturitatea de consum şi eliberării ei numai după îngheţarea ţesutului. În perioada degradării fructelor, probabil că fixarea enzimei pe structuri nu mai are loc şi astfel se observă creşterea activităţii ei în sucul vacuolar. Cantitatea de fosfaţi anorganici liberi urmează variaţia activităţii enzimei, constatîndu-se o scădere continuă şi mare, pînă la 30% în sucul vacuolar. În sucul plasmatic cantitatea lor rămîne constantă în primele 18 zile de depozitare, pentru ca la terminarea perioadei de maturitate de consum (32 zile de depozitare) să înregistreze un minim; după 53 zile cînd fructul este degradat se observă o acumulare a lor în sucul plasmatic. Dealtfel, teoria biostructurii localizează biochimismul compuşilor organofosforici în afara materiei biostructurate, ceea ce duce la variaţii semnificative în sucul vacuolar. Activitatea amilolitică în momentul depozitării merelor este maximă. Imediat după aceea scade, rămînînd ulterior la aceeaşi valoare. Concentraţia substanţelor reducătoare libere din sucurile vacuolar şi plasmatic creşte în special la atingerea maturităţii de consum, deoarece

Tabela 2

Merele Parmen auriu în perioada de depozitare

Suc		Zile de depozitare			
		0		18	
		La 1 ml suc	La vol. din 100 g material	La 1 ml suc	La vol. din 100 g material
ml suc la 100	*v*	—	34,00	—	35,00
g material	*p*	—	39,25	—	31,25
Activit. peroxidazei ml	*v*	0	0	0,07	2,62
I_2 N/50	*p*	0,07	2,94	0,06	1,87
Activit. catalazei	*v*	1,50	51,00	0	0
µl O_2 în 10 min la 15°C	*p*	2,00	78,00	0	0
Activit. fosfatazei	*v*	2,40	81,60	2,20	77,00
acide γP_i	*p*	0,40	15,60	0,60	18,70
Cantit. de *P*	*v*	19,00	656,00	19,00	665,00
anorg. liber γP_i	*p*	21,00	814,00	26,00	812,00
Activit. enzimelor amilolitice mg maltoză	*v*	0,86	29,20	0,49	17,10
	p	0,55	21,60	0,35	10,90
Cantit. subst. red. mg maltoză	*v*	112,00	4808,00	142,00	4970,00
	p	156,00	6123,00	160,00	5000,00

v = vacuolar; *p* = plasmatic.

Pentru determinări s-au folosit următoarele cantităţi de suc: activitatea peroxidazei — 5ml; activitatea catalazei — 4ml; activitatea fosfatazei acide — 10 ml; cantitatea fosfaţilor anorganici liberi — 4 ml; activitatea amilolitică — 1 ml; cantitatea substanţelor reducătoare libere — 1 ml suc diluţia 1/200; activitatea polifenoloxidazei nu a fost decelată cu 5 ml suc în reacţie.

cantitatea de apă din fructe scade. Cantitatea lor totală însă scade continuu în sucul vacuolar ceea ce arată consumul lor în procesele de respiraţie. În sucul plasmatic se observă de asemenea o scădere a cantităţii lor cu excepţia perioadei cînd fructul este degradat, iar structurile celulare cedează masiv componentele care le alcătuiesc.

Perele Curé (tabela 3). La pere, în perioada maturităţii de consum, pulpa devine zemoasă şi de aceea creşte masiv cantitatea sucului vacuolar pe seama sucului plasmatic, cu toate că în paralel are loc şi evaporarea apei libere din ele. Volumul sucului plasmatic după 32, respectiv 53 zile de păstrare rămîne constant, fapt care ar putea constitui un criteriu de apreciere a stării lor. Activitatea peroxidazei este decelată în ambele sucuri din momentul depozitării fructelor. În acest caz creşte activitatea enzimei din ambele sucuri pînă la maturitatea de consum, iar în sucul vacuolar şi în perioada de degradare a lor, pe cînd în sucul plasmatic în această perioadă rămîne la valori constante. Activitatea polifenoloxidazei la perele Curé este destul de mare. Activitatea acestei enzime în sucul vacuolar creşte continuu în perioada depozitării, pe cînd în sucul plasmatic creşte la început şi rămîne apoi constantă în momentul cînd fructul şi-a pierdut proprietăţile organoleptice. Activitatea catalazei se găseşte în sucul vacuolar şi doar ca urme în sucul plasmatic. În perioada maturităţii de consum, activitatea enzimei creşte în sucul vacuolar şi apoi scade. S-a determinat şi coeficientul de temperatură van't Hoff. Acest coeficient este egal cu 1 în perioada de maturitate fiziologică a fructelor şi aproximativ egal cu 2 în

perioada următoare. Aceasta arată fie că s-a modificat structura enzimei sau proprietăţile sale coloidale, fie că din cauza modificării compoziţiei mediului în care se găseşte, catalaza are nevoie de o energie de activare mai mare. Înclinăm pentru ultima ipoteză, deoarece într-o lucrare anterioară (6), am arătat că schimbarea mediului, determină schimbarea coeficientului de temperatură al catalazei, fapt care poate avea loc şi în cazul de faţă. Activitatea fosfatazei acide în ambele sucuri de la pere este mult mai mare, comparativ cu a sucurilor de la mere. În perioada de depozitare,

Tabela 3

Perele Curé în perioada de depozitare

Suc		Zile de depozitare							
		0		18		32		53	
		La 1 ml suc	La vol. din 100 g material	La 1 ml suc	La vol. din 100 g material	La 1 ml suc	La vol. din 100 g material	La 1 ml suc	La vol. din 100 g material
ml suc la 100 g material	*v*	—	20,00	—	29,00	—	35,50	—	39,00
	p	—	51,25	—	42,50	—	37,00	—	37,75
Activit. peroxidazei ml $I_2N/50$	*v*	0,35	7,00	0,45	13,05	0,40	14,20	0,50	19,50
	p	0,15	7,68	0,35	14,90	0,50	18,50	0,50	18,87
Activit. polifenoloxidazei ml I_2 N/50	*v*	0,30	6,00	0,45	13,05	0,35	12,42	0,60	23,40
	p	0,07	3,84	0,30	12,75	0,40	14,80	0,40	15,10
Activit. catalazei μl O_2 în 10 min la 15°C	*v*	18,00	360,00	28,60	829,00	13,50	479,00	12,50	487,00
	p	2,00	102,00	2,30	99,00	2,00	74,00	1,20	45,00
Activit. fosfatazei *v* acide γP_i	*v*	15,00	300,00	53,70	1557,00	74,30	2638,00	53,60	2090,00
	p	9,30	477,00	23,00	977,00	40,00	1480,00	24,30	916,00
Cantit. de P anorg. liber γ	*v*	46,00	920,00	60,00	1740,00	71,00	2520,00	115,00	4485,00
	p	53,00	1714,00	71,00	3017,00	78,00	2886,00	122,00	4605,00
Activit. enzimelor amilolitice mg maltoză	*v*	0,92	18,40	0,50	14,50	0,54	19,30	0,54	21,10
	p	0,37	19,00	0,27	11,50	0,43	15,90	0,25	9,40
Cantit. subst.red. activ mg maltoză	*v*	122,00	2440,00	130,00	3770,00	122,00	4361,00	134,00	5226,0
	p	118,00	6047,00	142,00	6035,00	126,00	4662,00	148,00	5587,0

v = vacuolar; *p* = plasmatic.

Pentru determinări s-au folosit următoarele cantităţi de suc; actvitatea peroxidazei — 1 ml; activitatea polifenoloxidazei — 1 ml; activitatea catalazei — 4 ml; activitatea fosfatazei acide — 3 ml; cantitatea fosfaţilor anorganici liberi — 1 ml; cantitatea amilolitică — 1 ml; cantitatea substanţelor reducătoare libere — 1 ml suc diluţia 1/200.

activitatea enzimei creşte în ambele sucuri pînă la maturitatea de consum, pentru ca apoi să scadă. Cantitatea de fosfaţi anorganici liberi urmează, ca şi la mere, variaţia activităţii enzimei cu excepţia fazei finale a păstrării cînd are loc o acumulare de fosfaţi anorganici ca urmare a degradării pulpei şi a lipsei proceselor anabolice. Sucurile vacuolar şi plasmatic conţin o activitate amilolitică de acelaşi ordin de mărime, dar ulterior activitatea amilolitică a sucului vacuolar creşte puţin, pe cînd activitatea sucului plasmatic scade mult. Aceasta s-ar putea explica prin faptul că la pere în

perioada de depozitare mai are loc încă zaharificarea amidonului. Cantitatea substanţelor reducătoare libere în sucul vacuolar creşte, pe cînd în sucul plasmatic scade, rezultate ce sînt în acord cu dinamica enzimelor amilolitice.

CONCLUZII

1. Urmărirea dinamicii unor indici biochimici din sucurile „vacuolar" şi „plasmatic" poate fi utilizată pentru demonstrarea şi chiar prevederea atît a maturităţii de consum, cît şi a proceselor de degradare a fructelor depozitate.

2. Cantitatea de suc vacuolar, respectiv plasmatic, din fructele puse la păstrare evoluează specific în funcţie de fruct (specie, gen) şi de starea lui fiziologică ; din momentul în care volumul sucului plasmatic rămîne constant, fructele au atins maturitatea de consum şi încep procesele de supramaturitate.

3. Începînd cu perioada de maturitate fiziologică enzimele respiratorii (peroxidaza, polifenoloxidaza şi catalaza) prezintă activităţi foarte scăzute în sucul vacuolar şi plasmatic din mere, dar pot fi detectate în ambele sucuri din pere.

4. La mere singurul indice care marchează maturitatea de consum este activitatea amilolitică care suferă o micşorare bruscă după care rămîne constantă.

5. La pere modificarea activităţii catalazei din sucul vacuolar (se micşorează), a activităţii peroxidazei şi polifenoloxidazei din sucul plasmatic (rămîne constantă), şi a activităţii fosfatazei acide din ambele sucuri se micşorează) marchează maturitatea de consum sau supramaturitatea, fenomene care au loc în perioada de păstrare.

Prezentată la redacţie
la 17 decembrie 1974

Institutul de ştiinţe biologice Bucureşti

THE DYNAMICS OF SOME ENZYME ACTIVITIES IN SAPS SQUEEZED OUT OF APPLES AND PEARS STORED AT 23° C BETWEEN THE PHYSIOLOGICAL MATURATION AND THE OVERRIPENING

SUMMARY

In apples, the consumption maturity is marked by a sudden decrease of the amylolytic activity, followed by a constant level of it, while the volume of the plasmatic sap is unchanged.

In pears, the consumption maturity and overripening are marked by changes in the evolution of catalase activity in vacuolar sap, and that of both peroxidase and polyphenoloxidase activity in plasmatic sap, as well as the acid phosphatase one in both saps ; the volume of plasmatic sap remains unchanged.

The study of the dynamics of "vacuolar" and "plasmatic" saps as well as that of some constituents inside them may be used to show and even predict the consumption maturity and overripening (i. e. degradation processes) in the fruits stored.

BIBLIOGRAFIE

1. A. Gheorghi, *Lucrări ştiinţifice* — Institutul de cercetări hortiviticole, **9**, 535 (1966).
2. E. Macovschi I. Cornoiu, St. cerc. biochim., **14**, 255 (1971).
3. E. Macovschi, *Biostructura*, Ed. Acad. R.S.R., Bucureşti, 1969.
4. E. Macovschi, *Natura şi structura materiei vii*, Ed. Acad. R.S.R., Bucureşti, 1972.
5. A. T. Ermakov, V. V. Afasimovici, *Metodi biochimicescovo isledovania rastenii*, Moscova, 1952, p. 65.
6. V. Alexandrescu, St. cerc. biochim., **13**, 233 (1970).
7. O. Lindberg, L. Ernster, în *Methods of biochemical analysis* (ed. D. Glick), vol. III, p. 1, Interscience publishers Inc. New York, 1956.
8. G. Noelting, P. Bernfeld, Helv. Chim. Acta, **31**, 286 (1948).
9. V. Alexandrescu, F. Mihăilescu, L. Păun, Rev. roum. Biochim., **12**, 61, (1975).

ST. CERC. BIOCHIM., 19, 1, 13–18 (1976)

EFECTUL ADMINISTRĂRII METIL-MERCURULUI ASUPRA ACTIVITĂȚII UNOR ENZIME IMPLICATE ÎN METABOLISMUL GLUCIDIC

LIANA BOGHIANU

Rezumat. S-a cercetat pe 40 șobolani influența metil-mercurului, în doză de 1 ppm, asupra creșterii șobolanilor și asupra activității următoarelor enzime din ficat și creer: fosforilaza *a*, *b* și totală, glucozo-6-fosfat dehidrogenaza (G6PDH), glucozo-6-fosfataza, aldolaza, lactat dehidrogenaza (LDH), succinat dehidrogenaza și succinat oxidaza. Metil-mercurul a determinat o creștere de 41% a activității G6PDH și o inhibiție de 20% a activității LDH din ficat după 30 de zile de administrare. După 60 de zile de administrare activitățile G6PDH și LDH nu mai prezintă modificări semnificative, ceea ce arată că variațiile înregistrate se încadrează în limitele fiziologice ale unui mecanism de adaptare.
Se poate considera că doza de 1 ppm determină apariția primului semnal de alarmă la stress-ul chimic provocat de administrarea metil-mercurului.

Problema toxicității mercurului s-a pus cu deosebită acuitate odată cu apariția în Japonia și apoi în Suedia a acelor cunoscute cazuri de intoxicație în masă în urma consumului de pește care conținea acumulate concentrații mari de mercur datorită poluării mărilor.

Odată cu cercetările privind gradul de contaminare a produselor alimentare cu mercur, s-au inițiat studii pentru cunoașterea modului de acțiune al Hg în provocarea fenomenelor toxice și stabilirii concentrației maxime admisibile în conținutul rezidual de Hg din produsele alimentare. Astfel, O.M.S. recomandă un procent de mercur de 0,05 ppm în alimente, normă care nu este însă respectată. Franța admite 0,7 ppm, America 0,5 și Suedia pînă la 1 ppm Hg în hrană, deci doză de 20 de ori mai mare față de cea admisă de O.M.S.

Din cercetările efectuate în intoxicațiile cronice și acute cu mercur se constată pe prim plan alterațiuni în activitatea sistemului nervos central, cu apariția unor tulburări grave, fără însă ca acestea să fie explicate.

În ultimii ani au apărut lucrări izolate demonstrînd o perturbare a sintezei de proteine produsă de Hg, prin modificări ale metabolismului acizilor nucleici, leziuni ale membranei celulare provocînd modificări de permeabilitate și o inhibiție a enzimelor conținînd grupe SH (1).

Din punctul de vedere al toxicității, compușii organomercurici (metil și etil-mercurul) fac parte din categoria cea mai toxică, datorită faptului că sînt stabili, circulă mult timp nemodificați în sînge și se elimină lent. Mai mult de 90% din mercurul total din creer și hematii se află sub formă de monometil-mercur. Modul de acțiune al organo-mercurialelor nu se cunoaște, cum nu se cunoaște pînă azi nici doza la care apar primele semne detectabile ale intoxicației cu mercur.

Lucrarea de față își propune să aducă o contribuție în cunoașterea mecanismelor de acțiune ale mercurului. În acest scop s-a urmărit în dinamică influența metil-mercurului, în doză apropiată de cele întîlnite în practică, asupra unor enzime implicate în metabolismul glucidic și energetic. Alegerea enzimelor din metabolismul glucidic s-a făcut pe baza unor cercetări proprii anterioare (2), (3) care arată sensibilitatea deosebită a acestora la administrarea unor doze mici de metale.

MATERIAL ŞI METODE

Cercetările s-au efectuat pe un număr de 40 şobolani albi Wistar, masculi, din aceeaşi generaţie, de cca 45 g, împărţiţi în două serii experimentale, cîte două loturi a 10 animale în fiecare serie. În prima serie s-a urmărit influenţa metil-mercurului administrat în hrană, în doză de 1 ppm, timp de 30 de zile, iar în a doua serie timp de 60 de zile.

Stabilirea acestei doze (1 ppm) s-a făcut ţinînd seama pe de o parte de faptul că nu se cunoaşte pînă astăzi doza minimă la care apar primele semne detectabile ale intoxicaţiei cu Hg, iar pe de altă parte de faptul că doza de 1 ppm este atinsă astăzi în unele ţări.

În timpul experienţelor animalele au fost ţinute în cuşti individuale şi au primit un regim semisintetic ce conţinea în g la 100 g hrană : cazeină 9, amidon 69, ulei de floarea soarelui 12, amestec de săruri Osborne — Mendel 4, drojdie de bere uscată 4, substanţă de balast 2. În reducerea aportului proteic şi creşterea aportului lipidic al regimului s-a ţinut seama de faptul că în această condiţie se măreşte sensibilitatea testului toxicologic. Săptămînal s-a administrat per os, fiecărui animal : vitamina A 270 U.I., vitamina E 1 mg şi vitamina D_2 100 U.I.

Proba de creştere s-a efectuat timp de 30 şi 60 de zile, urmărindu-se în acest interval cîştigul săptămînal în greutate, greutatea finală a animalelor, ingesta de alimente şi eficienţa hranei (cîştigul în greutate/g de hrană ingerată).

La sfîrşitul experienţelor (perioadei de intoxicare) animalele au fost sacrificate şi s-a prelevat ficatul şi creerul care au fost omogenizate la aproximativ 2°C în medii de extracţie şi diluţii diferite.

În omogenatele de ficat s-au determinat activităţile următoarelor enzime : fosforilaza *a* şi fosforilaza totală (4). Activitatea fosforilazei *b* a fost apreciată din diferenţa între activitatea fosforilazică totală şi activitatea fosforilazei *a*. Rezultatele au fost exprimate în μmoli PO_4^{3-}/g ficat/min. Activitatea glucozo-6-fosfat dehidrogenazei (G6PDH) a fost determinată după metoda indicată de C. W. Löhr (5) iar rezultatele exprimate în unităţi Wroblewsky. Activitatea glucozo-6-fosfatazei (G6P) s-a determinat după metoda indicată de A. E. Harper (6) şi a fost exprimată în μmoli fosfat/g ficat/min. Activitatea aldolazei a fost determinată după metoda H. U. Bergmeyer (7) rezultatele exprimîndu-se în μmoli fructozo-1, 6-fosfat/g ficat/oră, iar a lactat dehidrogenazei (LDH) prin metoda G. Weber (8) exprimată în μmoli piruvat/g ficat/oră. Activitatea succinat dehidrogenazei (SD) s-a determinat după metoda Kun (9) rezultatele exprimîndu-se în γ formazan/mg ficat/15 min, iar a succinat oxidazei (SO) prin metoda manometrică convenţională Warburg, rezultatele exprimîndu-se în μl O_2/50 mg ficat/h.

În omogenatul de creer s-a determinat activitatea succinat oxidazei după aceeaşi metodă.

Rezultatele obţinute au fost prelucrate statistic prin metoda analizei varianţei (10), indicîndu-se gradul de semnificaţie cu o probabilitate de 99,95 şi 99,99%.

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Administrarea repetată a metil-mercurului în doze de 1 ppm unor loturi diferite de șobolani masculi, timp de 30 de zile (etapa I-a)și de 60 de zile (etapa a II-a), nu a influențat creșterea șobolanilor, greutatea finală a loturilor experimentale fiind apropiată de cea a lotului martor (tabela 1). Ingesta și eficiența proteică a loturilor care au primit metil-mercur nu au prezentat de asemenea modificări față de martori (tabela 1).

Tabela 1

Influența administrării metil-mercurului în doză de 1 ppm timp de 30 și 60 de zile asupra creșterii șobolanului alb

Lotul	Nr. șob.	Greut. inițială	Greutate finală			Ingesta medie pe zi			Eficiența hranei		
			Medie	*ES*	*P*	Medie	*ES*	*P*	Medie	*ES*	*P*
30 de zile											
I. Martor	10	44,9	169,9	3,69		15,4	0,27		0,27	0,007	
II. Hg 1 ppm	10	44,9	158,8	6,94	0,05	15,0	0,38	0,05	0,25	0,012	0,05
60 de zile											
I. Martor	10	45,0	231,2	9,32		16,2	0,49		0,19	0,006	
II. Hg 1 ppm	10	44,9	243,0	8,57	0,05	17,2	0,25	0,05	0,19	0,009	0,05

Considerînd proba de creștere ca un indicator global de toxicitate, se poate conchide că la doza de 1 ppm și în condițiile noastre experimentale, metil-mercurul nu a determinat efecte toxice evidente. Totodată valorile apropiate și ritmul reproductibil de creștere arată că experiențele s-au desfășurat în condiții standardizate în care nu au intervenit alte situații particulare în afara acțiunii substanței testate.

Metil-mercurul în doză de 1 ppm a determinat însă modificări ale activității unora din enzimele hepatice testate după 30 de zile de administrare (tabela 2). Astfel, activitatea G6PDH a prezentat o creștere semnificativă statistic de 41% la lotul care a primit metil-mercur, față de lotul martor. Această creștere a activității enzimei ar putea fi interpretată fie ca o stimulare a metabolismului glucidic pe calea șuntului pentozo fosforic necesară într-o condiție de stress, fie ca inducția sintezei de enzimă determinată de metil-mercur. Faptul că după 60 de zile de administrare a metil-mercurului activitatea G6PDH nu mai prezintă modificări semnificative față de martor (tabela E_2), arată că activarea înregistrată în prima etapă se încadrează în limitele fiziologice ale unui mecanism de adaptare.

Activarea LDH a prezentat o scădere semnificativă statistic de 19% față de martor după 30 de zile de administrare a metil-mercurului (tabela 2). Această scădere ar putea fi explicată fie printr-o eliberare a enzimei din celula hepatică în urma unor leziuni biochimice — modificări ale permeabilității de membrană — fie printr-o inhibiție parțială a enzimei, determinată de metil-mercur. Această inactivare parțială a enzimei este în concordanță cu datele din literatură (11) care arată că Hg^{2+} reac-

Tabela 2

Influența administrării metil-mercurului în doză de 1 ppm timp de 30 și 60 de zile, asupra activității unor enzime din ficat și creer

Indicatori	30 de zile			60 de zile		
	Lot I Martor	Lot II Hg 1 ppm		Lot I Martor	Lot II Hg 1 ppm	
	Medie	Medie	Diferența la medie	Medie	Medie	Diferența la medie
Fosforilaza *a*	61,6	58,4		37,0	25,0	
Fosforilaza *b*	409,0	386,7		336,0	294,0	
Fosforilaza totală (*a*+*b*)	470,6	445,0		376,0	333,0	
G 6 P	19,5	20,3		21,3	17,7	
G 6 PDH	2151	3035	884*	2089	2484	
Aldolaza	1029	1111		874	872	
L D H	8454	6872	1582*	5347	5999	
S D	1,69	1,54		1,78	1,66	
S O — ficat	152	163		167	159	
S O — creer	74	75		85	82	

* $DL_{0.05}$ −706
** $DL_{0.05}$ −1399

ționează cu un grup esențial SH, formînd un semimercaptid, care leagă apoi alt grup SH din apropierea sa, ceea ce afectează structura centrului activ al LDH. Dar, ca și în cazul G6PDH, modificarea activității LDH dispare după 60 de zile de administrare a metil-mercurului, ceea ce arată că și în cazul acesta fenomenul se încadrează în limitele fiziologice de adaptare.

După 60 de zile de administrare metil-mercurul a determinat o scădere de 32% a activității fosforilazei a. Această scădere, deși nesemnificativă statistic trebuie subliniată și s-ar putea explica printr-o interferență a Hg^{2+} asupra acțiunii unei kinaze care activează fosforilaza.

Faptul că activitățile unor enzime situate în puncte nodale ale metabolismului glucidic, fosforilazele *a*, *b* și totală, glucozo-6-fosfataza și aldolaza nu au prezentat modificări semnificative, arată că doza de 1 ppm metil-mercur nu a influențat acest metabolism. De asemenea lipsa de variații în activitatea SD și SO din ficat și creer arată că metilmercurul în doză de 1 ppm nu interferă în metabolismul energetic la nivel celular.

Din rezultatele obținute se poate trage concluzia că doza de 1 ppm metil-mercur nu provoacă efecte toxice evidente și nici leziuni biochimice

importante. Totuși faptul că la acestă doză apar modificări ale activității G_6PDH și LDH, deși considerate în cadrul variațiilor fiziologice adaptative, nu poate fi neglijat, ci trebuie considerat ca primul semnal de alarmă al organismului la stress-ul chimic provocat de administrarea metil-mercurului.

CONCLUZII

Din experiențele efectuate se constată că la doza de 1 ppm metil-mercur nu se înregistrează efecte toxice evidente (nu se modifică creșterea). Metil-mercurul a determinat o creștere de 41% a activității G6PDH și o inhibiție de 20% a LDH în ficat, după 30 de zile de administrare. Se consideră că variațiile acestor enzime se încadrează în limitele fiziologice ale unui proces de adaptare, deoarece după 60 de zile de administrare nu mai apar modificări. În vederea stabilirii concentrației maxime admisibile, se constată că la doza de 1 ppm apare primul răspuns al organismului la strees-ul chimic provocat de administrarea metil-mercurului. Sub această optică doza de 0,05 ppm fixată de O.M.S. ni se pare justificată, ținînd seama de fenomenul de acumulare al Hg^{2+}, prin ingestia repetată a produselor alimentare poluate cu mercur.

Prezentat la redacție
la 20 aprilie 1974

*Institutul de igienă
și sănătate publică, București*

EFFECT OF METHYL-MERCURY ADMINISTRATION ON THE ACTIVITY OF CERTAIN ENZYMES INVOLVED IN CARBOHYDRATE METABOLISM

SUMMARY

Experiments were performed in 40 white rats, in order to study the influence of methyl-mercury administration in dose of 1 ppm, on the growth test and on the activities of the following liver and brain enzymes : phosphorylases *a* and *b*, glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH), glucose-6-phosphatase, aldolase, lactate dehydrogenase (LDH), succinate dehydrogenase (SD) and succinate oxidase. Methyl-mercury has provoked an increase (of 41 per cent) of the liver glucose-6-phosphate dehydrogenase activity and an inhibition (of 20 per cent) of the lactate dehydrogenase activity in liver after 30 days of administration. After 60 days of administration the activities of G6PDH and LDH have not presented significant changes ; this fact shows that the registered results are framing among physiological limits of an adaptating mechanism.

We consider that the dose of 1 ppm determines the first alarm sign at the chemical stress provoked by methyl-mercury administration.

BIBLIOGRAFIE

1. * * * Arch. Environ. Health, **19**, 891 (1969).
2. A. Sporn, Ileana Dinu, Liana Boghianu, Rev. Roum. Biochim., **7**, 299 (1970).
3. Ileana Dinu, Liana Boghianu, Rev. Roum. Biochim., **10**, 105 (1973).
4. W. H. Danforth, E. Helmreich, C. F. Cori, Proc. Natl. Acad. Sci., **48**, 1191 (1962).
5. C. W. Lohr, H. D. Waller, În *Methods of Enzymatic Analysis*, Edited by H.U. Bergmeyer, Academic Press, New York, 1963, p. 744.
6. A. E. Harper, În *Methods of Enzymatic Analysis*, Edited by H.U. Bergmeyer, Academic Press, New York, 1963 p. 788.
7. H. F. Bruns, H. U. Bergmeyer, In *Methods of Enzymatic Analysis*, Edited by H.U. Bergmeyer, Academic Press, New York, 1963, p. 724.
8. G. Weber, J. Nutr., **71**, 156 (1960).
9. S. Kun, L. G. Abood, Science, **109**, 144 (1949).
10. H. Slusanski, St. cerc. biochim., **8**, 345 (1965).
11. N. I. Maltev, E. J. Schehoss, Biochimia, **36**, 761 (1971).

ST. CERC. BIOCHIM., 19, 1, 19–24 (1976)

RIBONUCLEAZELE DIN PLANTULELE DE MAZĂRE (*PISUM SATIVUM*) CRESCUTE LA ÎNTUNERIC ŞI ÎN REGIM DE LUMINĂ-ÎNTUNERIC

LILICA BOTOŞENEANU şi S. VASU

Rezumat. S-a urmărit activitatea şi formele moleculare multiple ale RN-azelor din axul embrionar şi cotiledoane, după 2 zile, şi din frunze, tulpini, rădăcini şi cotiledoane, după 5 şi 9 zile de creştere la întuneric şi în regim de lumină-întuneric. Condiţiile de iluminare nu influenţează activitatea RN-azică a plantulelor după 2 zile. La întuneric activitatea RN-azică creşte în frunze, la pH 5,2 şi pH 7,2, după 5 şi 9 zile şi în tulpini, după 9 zile; scade în rădăcini, la pH 7,2, după 5 şi 9 zile şi în cotiledoane, numai după 9 zile. Cea mai mică activitate o prezintă cotiledoanele iar cea mai mare, rădăcinile. În funcţie de vîrsta plantulelor, activitatea RN-azică creşte în cotiledoane şi scade în frunze. Rezultatele electroforetice vin parţial în sprijinul celor obţinute prin determinarea activităţii enzimatice globale.

În germinarea seminţelor şi în creşterea plantulelor de mazăre, variaţiile cantitative ale acizilor nucleici (1)(2) ca şi cele ale unor specii moleculare de acizi ribonucleici (RNA) (3)(4) sînt însoţite de modificări ale activităţii ribonucleazice (RN-azice) (1)(5)(6). Deoarece, RNA din plantulele de mazăre crescute în regim de lumină-întuneric prezintă în gelul de agaroză o mai mare eterogenitate decît cei din mazărea crescută la întuneric (4), ne-am propus să urmărim activitatea RN-azelor din diferitele organe ale plantulelor în condiţiile germinării seminţelor şi creşterii plantulelor la întuneric şi în regim de lumină-întuneric.

MATERIAL ŞI METODE

S-au folosit seminţele hibridului de mazăre E-53/54 (ICCPT-Fundulea), germinate şi crescute timp de 2,5 şi 9 zile la întuneric şi în regim de lumină-întuneric (12—14 ore lumină fluorescentă din 24 ore).

Organele plantulelor de mazăre, separate, s-au omogenizat la rece, prin mojarare şi în omogenizator Potter-Elvehjen, cu soluţie tampon Tris (hidroxi-metilamino-metan) 0,03 M-HCl, zaharoză 0,5 M, $MgCl_2$ 0,005M şi NaCl (pH 7,3), recomandată de Lyndon (7), în raport de 2 ml/g material proaspăt pentru frunze, tulpini şi rădăcini, şi de 1 ml/g pentru cotiledoane. După filtrare prin 4 straturi de tifon, filtratele s-au supus centrifugării timp de 15 min. la 800 g; supernatantele, păstrate la —15°C, s-au folosit pentru urmărirea activităţii RN-azice şi a conţinutului în proteină.

Activitatea RN-azică s-a determinat şi exprimat în unităţi convenţionale, după cum am arătat într-o altă lucrare (6).

Proteinele s-au determinat prin metoda Lowry, modificată de Miller (8).

Electroforeza extractelor enzimatice, în plăci de gel de poliacrilamidă (6%), şi evidenţierea ulterioară a speciilor moleculare cu activitate RN-azică s-au efectuat în condiţiile arătate anterior (6).

REZULTATE ŞI DISCUŢII

S-au efectuat trei serii de experienţe în care s-au urmărit activitatea şi formele moleculare multiple ale RN-azelor din organele plantulelor de mazăre germinate şi crescute la întuneric şi în regim de lumină-întuneric : după 2 zile în axul embrionar (care conţine frunzele, tulpinile şi rădăcinile încă nediferenţiate bine) şi în cotiledoane, şi după 5 şi 9 zile în frunze, tulpini, rădăcini şi cotiledoane. Rezultatele obţinute în cadrul uneia din aceste experienţe sînt cuprinse în tabela 1 şi în figura 1.

Tabela 1

Activitatea RN-azică din organele plantulelor de mazăre crescute la întuneric şi în regim de lumină-întuneric (unit. RN-ază/mg proteină)

Organul	Ziua	Întuneric		Lumină—întuneric	
		RN—aze pH 5,2	RN—aze pH 7,2	RN—aze pH 5,2	RN—aze pH 7,2
Ax embrionar	2	237	360	249	370
Cotiledoane		1	8	9	9
Frunze	5	568	884	273	683
Tulpini		519	1286	672	1380
Rădăcini		816	992	944	1559
Cotiledoane		79	66	58	71
Frunze	9	412	783	184	405
Tulpini		874	1915	670	1075
Rădăcini		1004	838	860	1586
Cotiledoane		110	107	132	318

După cum reiese din tabela 1, activitatea RN-azică din plantulele de mazăre crescute la întuneric şi din cele crescute în regim de lumină-întuneric indică valori asemănătoare după 2 zile dar diferite în unele organe după 5 şi 9 zile. Astfel, în frunzele plantulelor crescute la întuneric, activitatea RN-azică e mai mare decît în cele crescute la lumină-întuneric, la ambele pH-uri. Acest fapt reiese şi din fig. 1 în care se vede că în frunzele etiolate, apare după 5 zile o fracţie RN-azică în plus la pH 7,2, iar unele fracţii comune prezintă o activitate mai mare decît în frunzele crescute la lumină-întuneric.

Un efect similar se observă şi la tulpini unde, la întuneric, activitatea RN-azică este mai mare la 9 zile ; la 5 zile, la pH 7,2, în urma electroforezei apar fracţii RN-azice mai multe, unele avînd activitate mai mare.

În cazul rădăcinilor, după 5 şi 9 zile, activitatea RN-azică este însă mai mică în plantulele de la întuneric, faţă de cele crescute în regim de lumină-întuneric. Numai la 9 zile găsim o uşoară creştere a activităţii RN-azice la pH 5,2 în rădăcinile plantulelor crescute la întuneric. Determinările electroforetice vin în sprijinul acestei observaţii.

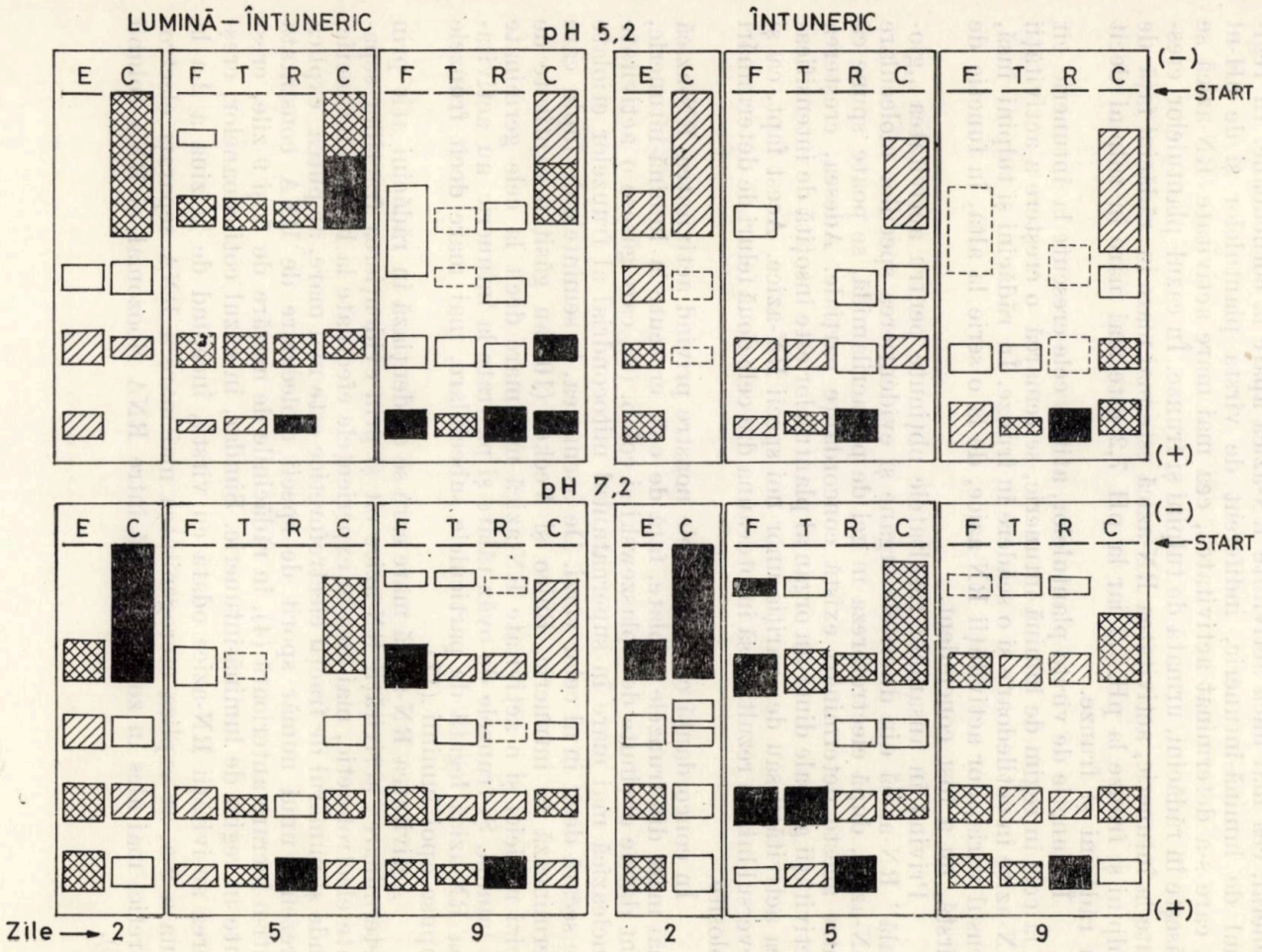


Fig. 1. — Formele moleculare multiple ale RN-azelor din organele plantulelor de mazăre crescute la întuneric și în regim de lumină-întuneric, evidențiate în urma electroforezei în gel de poliacrilamidă. (Plăcile de gel de poliacrilamidă 6 %, 15 × × 11 × 0,3 cm; tampon 0,2 M Tris-acid citric, pH 7,9; 7 ore la 140 V, 1—1,5 mA/cm; 30 min în RNA 0,5 % tamponat la pH-ul dorit; 60 min incubare la 37°C în cameră umedă; 90—120 min în etanol 25 %-acid citric 5 %; colorarea RNA nehidrolizat cu 0,2 % albastru de toluidină în acid acetic 1 % și spălarea gelului cu acid acetic 2 % și apă distilată. *E* = ax embrionar; *C* = cotiledoane; *F* = frunze; *T* = tulpini; *R* = rădăcini).

Activitatea RN-azică din cotiledoane, aproximativ asemănătoare la plantulele în vîrstă de 5 zile, scade după 9 zile în plantulele crescute la întuneric, față de cele crescute la lumină-întuneric, la ambele pH-uri, și mai ales la pH 7,2. Și electroforetic, la pH 7,2, după 9 zile găsim la cotiledoanele crescute la lumină un număr de fracții mai mare decît la cele crescute în lumină-întuneric.

Comparînd activitatea RN-azică a diferitelor organe, după cum se vede din tabela 1, indiferent de regimul de iluminare al plantulelor, în general, cea mai mică activitate RN-azică apare la cotiledoane. În regimul de lumină-întuneric, indiferent de vîrsta plantulelor și de pH-ul la care s-a determinat activitatea, cea mai mare activitate RN-azică se găsește în rădăcini, urmată de tulpini și frunze. În cazul plantulelor crescute la întuneric, activitatea RN-azică este mai mare în rădăcini față de tulpini și frunze la pH 5,2 iar la pH 7,2 este mai mare în tulpini decît în rădăcini și frunze.

În funcție de vîrsta plantulelor, atît la cele crescute la întuneric cît și la cele în regim de lumină-întuneric, se remarcă o creștere a activității RN-azice în cotiledoane și o scădere în frunze. În rădăcini și tulpini însă, sensul variațiilor activității RN-azice, de la o serie la alta, în funcție de vîrstă, nu a fost concludent.

Privind în ansamblu rezultatele obținute pentru activitatea „globală" RN-azică din diferitele organe și evidențierea speciilor moleculare RN-azice, după electroforeza în gel de poliacrilamidă, se poate spune că între aceste determinări există concordanțe parțiale. Adesea, creșterea activității globale dintr-un organ al plantulelor este însoțită de intensificarea activității sau de apariția unor noi specii RN-azice. Acest fapt, ca și reversul lui, nu rezultă însă întotdeauna din cele două feluri de determinări folosite.

În concordanță cu rezultatele noastre privind activitatea RN-azică mai mare din frunzele etiolate, față de cele crescute la lumină-întuneric, sînt datele obținute de Golaszewski și colab. (9), care găsesc o activitate nucleazică mai mare în supernatantul mitocondrial al frunzelor etiolate de secară decît în al celor verzi. De asemenea, la semințele de lupin care germinează la întuneric, Bulco și Vecker (10) au găsit o cantitate de acizi nucleici și o activitate RN-azică mai mare decît la cele germinate la lumină. Și frunzele de ovăz tăiate și păstrate la întuneric au activitatea RN-azică legată de particulele subcelulare, mai mare decît frunzele supuse apoi luminii (11).

Activitatea RN-azică mare care se evidențiază în rădăcini atît prin determinarea activității RN-azice cît și prin evidențierea fracțiilor separate electroforetic, mai ales în experiențele efectuate la lumină-întuneric, unde și numărul de fracții electroforetice este mai mare, ar putea explica prezența unui număr sporit de specii moleculare de RNA constatată într-o lucrare anterioară (4), în rădăcinile de mazăre de 5 și 9 zile, crescute în regim de lumină-întuneric. Similar, în cazul cotiledoanelor, creșterea activității RN-azice odată cu vîrsta, începînd de la ziua a 2-a la ziua a 9-a, ar explica eterogenitatea mai mare a RNA separați electroforetic, mai ales în zona cuprinsă între RNA ribozomal și RNA solubil (4).

În general, condițiile de stress, ca de ex. infecția virală sau rănirea mecanică a frunzelor de tutun (12), ca și șocul osmotic al protoplastelor izolate din frunzele de tutun (12) sau iluminarea hipocotilului de lupin etiolat (14), s-a arătat că produc o intensificare a activității RN-azice. S-ar putea deci ca intensificarea activității RN-azice la frunzele plantulelor de mazăre crescute la întuneric, ca și la rădăcinile și cotiledoanele menținute la lumină-întuneric, să se datoreze tot unor condiții neobișnuite, de stress, pentru organele respective.

CONCLUZII

1. Activitatea RN-azică crește la întuneric, în frunze, la ambele pH-uri după 5 și 9 zile și în tulpini, după 9 zile.

2. Activitatea RN-azică scade la întuneric în rădăcini, la pH 7,2, după 5 și 9 zile și în cotiledoane, numai după 9 zile.

3. Cea mai mică activitate RN-azică o prezintă cotiledoanele și cea mai mare, rădăcinile.

4. În funcție de vîrsta plantulelor, activitatea RN-azică crește în cotiledoane și scade în frunze.

5. Rezultatele electroforetice vin parțial în sprijinul celor obținute prin determinarea activității enzimatice globale.

Prezentat la redacție
la 10 octombrie 1975

Departamentul de biochimie
Institutul de științe biologice-București

RIBONUCLEASES IN PEA (*PISUM SATIVUM*) SEEDLINGS GROWN IN THE DARK AND IN THE LIGHT-DARK REGIMES

SUMMARY

The activity and multiple molecular forms of RN-ases were studied in the dark and in the light-dark regimes from the embryonic axis and from cotyledons after 2 days of germination, and from leaves, stems, roots and cotyledons, after 5 and 9 days of germination. The lighting conditions do not influence the RN-ase activity in the seedlings after 2 days. In the dark, the RN-ase activity increases in leaves at pH 5.2 and 7.2 after 5 and 9 days, as well as in stems after 9 days, but decreases in the roots at pH 7.2 after 5 and 9 days, as well as in cotyledons but only after 9 days. The lowest activity was found in cotyledons, and the highest in roots. Depending on the age of the seedlings, the RN-ase activity increases in cotyledons and decreases in leaves. Electrophoretic patterns partly corroborate the results obtained by the determination of the RN-ase activity.

BIBLIOGRAFIE

1. G. Barker, Th. Douglas, Nature, **188**, 943 (1960).
2. R. van Parijs, Arch. Intern. Physiol. Biochim., **75**, 125 (1965).
3. L. Botoşeneanu, S. Vasu . Rev. roum. Biochim., **6**, 263 (1969).
4. L. Botoşeneanu, S. Vasu, St. cerc. biochim., **14**, 5 (1971).
5. G. Barker, J. Hollinshead, Nature, **212**, 925 (1966).
6. L. Botoşeneanu, S. Vasu, St. cerc. biochim., **15**, 9 (1972).
7. R. Lyndon, Biochim. Biophys. Acta, **113**, 110 (1966).
8. G. Miller, Anal. Chem., **31**, 964 (1959).
9. T. Golaszewski, J. W. Szarkowski, M. Ombach, Acta Soc. Bot. Pol., **36**, 199 (1967).
10. O. P. Bulko, A. S. Vecker, Dokl. Akad. Nauk. Belorussk. S.S.R., **9**, 262 (1965).
11. J. Udvardy, G. L. Farkas, E. Marre, G. Forty, Physiol. Plant., **20**, 781 (1967).
12. N. V. Wyeu, J. Udvardy, S. Erdei, G. L. Farkas, Virology, **48**, 337 (1972).
13. G. Lázár, G. Borbély, J. Udvardy, G. Permecz, G. L. Farkas, Plant. Sci. Lett., **1**, 53 (1973).
14. G. J. Acton, R. J. Liwington, A. Myers, Biochim. Biophys. Acta, **204**, 144 (1970).

ST. CERC. BIOCHIM., 19, 1, 25–31 (1976)

NOI OBSERVAȚII ASUPRA MODIFICĂRILOR BIOCHIMICE DIN CARNEA PORCILOR CU MIOPATIE EXUDATIVĂ

L. M., BURUIANĂ D. M., MIHAI D. CURCĂ

Rezumat. Creşterea intensivă a porcilor este din ce în ce mai frecvent însoţită de apariţia sindromului de stress (PSS) sau miopatie exudativă. Această afecţiune face ca animalele bolnave să furnizeze o carne cu calităţi biologice şi tehnologice inferioare, cunoscută sub denumirea de carne PSE sau DFD.
Determinînd aminoacizii totali şi cei liberi din carnea animalelor bolnave s-au constatat modificări importante faţă de carnea provenind dela animalele sănătoase. Cantitatea aminoacizilor totali scade cu excepţia hidroxi-prolinei care creşte. În cazul aminoacizilor liberi unii scad iar alţii ca : cistina, lizina, arginia, histidina, acidul aspartic şi acidul glutamic cresc. Aceste variaţii depind şi de regiunea anatomică de unde se recoltează muşchiul. Amoniacul creşte de asemenea în carnea proaspătă cu PSE. Valoarea biologică apreciată prin indicele EAA a lui Oser scade. Modificările înregistrate, întăresc după părerea autorilor, teoria despre originea genetică a sindromului de stress la porcine.

Odată cu sporirea masivă a producţiei de carne de porc, îşi fac apariţia şi unele defecte ale calităţii cărnii, care ridică probleme serioase atît pentru industria prelucrătoare cît şi pentru consumul şi congelarea cărnii ca atare. Mai răspîndite sînt modificările cunoscute sub denumirea de carne P.S.E şi carne D.F.D. provenind de la porcii stress susceptibili (P.S.S.).

Carnea P.S.E. (pale, soft, exudative) se caracterizează printr-un aspect mai palid decît cea provenită de la animalele sănătoase, are o hidrofilie scăzută ceea ce favorizează eliminarea masivă şi rapidă a apei după sacrificare, constatîndu-se totodată o scădere rapidă a pH-ului (sub pH 5,8, în mai puţin de 1 oră de la sacrificare). Din punct de vedere biochimic se observă o glicoliză intensă cu formarea unei mari cantităţi de acid lactic, degradarea rapidă a creatin-fosfatului şi ATP-lui.

În schimb carnea DFD (dark, firm, dry) se caracterizează biochimic printr-o anaerobioză tisulară exagerată şi intensificarea glicolizei încă înainte de sacrificare. În acest caz apa din muşchi şi acidul lactic format difuzează în sînge din care cauză carnea se caracterizează organoleptic printr-un aspect mai întunecat, întărit şi uscat iar pH-ul nu va scădea nici după o păstrare de 24 ore la rece. Animalele cu sindromul PSE şi DFD sînt expuse morţii fulgerătoare înainte de sacrificare datorită stressului de transport sau asomare. Pagubele provocate din acest motiv sînt mari, iar carnea PSE şi DFD are calităţi organoleptice şi tehnologice necorespunzătoare. Puterea de reţinere a apei este redusă şi deci capacitatea de emulsionare se micşorează. Gelatinizarea jambonului creşte la fierbere iar gustul şi aspectul se modifică nefavorabil. Utilizarea industrială necesită o tehnologie mai complicată iar consumul cărnii proaspete sau congelate întîmpină rezistenţă din partea consumatorilor.

Cauzele acestor afecţiuni sînt intens cercetate, biochimia furnizînd deja date importante care au permis cunoaşterea mecanismului şi a cauzelor care provoacă modificările amintite mai sus.

Opinia specialiştilor cu privire la cauza acestui sindrom, înclină mai ales către existenţa unui defect genetic care atrage după sine o modificare a structurii şi implicit a activităţii unor proteine musculare. Cercetări anterioare ne-au arătat o creştere cantitativă a colagenului şi o modificare a structurii sale (1) precum şi schimbarea aspectului proteinogramei extractelor musculare (2).

În prezenta lucrare s-a determinat compoziţia în aminoacizi liberi şi totali (după hidroliză) din carnea PSE comparativ cu carnea normală, deoarece se ştie că structura primară determină conformaţia şi funcţia macromoleculelor proteice.

MATERIAL ŞI METODE

Deoarece în sindromul PSE muşchii : longissimus dorsi, semimembranosus şi semitendinosus (cotletul şi jambonul) sînt aproape exclusiv afectaţi, analizele noastre au fost executate pe aceştia. Animalele au fost examinate după sacrificare atît din punct de vedere sanitar veterinar cît şi organoleptic. La acelea la care s-au constatat semne specifice cărnii PSE s-au recoltat probe medii în vederea analizelor în laborator.

În acest scop se omogeniza mecanic circa 100 g carne din muşchii amintiţi din care se punea la hidrolizat în fiole cîte 0,5 g şi 20 ml soluţie HCl 6 N. Fiolele închise se ţineau 24 ore la temperatura de 115°. Hidrolizatul se evapora apoi la sec pe baia de apă, repetîndu-se operaţia după adăogarea de apă distilată, de 3—4 ori pentru îndepărtarea cît mai complet posibil a acidului clorhidric. Reziduul se lua cu apă distilată aducîndu-se la balon cotat. Într-o alicotă din filtrat se determinau aminoacizii prin cromatografie pe hîrtie. După 3 irigări spoturile bine delimitate se decupau şi eluau determinîndu-se concentraţia colorimetric. Se raporta la 100 g carne umedă sau la 100 g proteină dozată cu metoda Parnas-Wagner.

Pentru determinarea triptofanului, hidroliza cărnii se făcea în aceleaşi condiţii utilizînd hidroliza alcalină cu ajutorul hidroxidului de sodiu 5 N în prezenţa pulberii de zinc (pentru evitarea reacţiilor Maillard), timp de 5 ore la 115°. După neutralizare hidrolizatul se aducea la balon cotat şi se doza triptofanul cu metoda lui Sullivan şi Hess (3).

Amoniacul liber şi uşor hidrolizabil (aminic şi amidic) se determina prin distilare în prezenţa MgO şi titrare sau nesslerizare. pH-ul se determina potenţiometric diluînd omogenatul de carne imediat după obţinere cu apă distilată neutră în proporţie de 1 :4.

Hidroxi-prolina se determina din hidrolizatul proteic cu metoda lui Neuman şi Logan (4). Din cantitatea găsită se calcula colagenul prin multiplicare cu factorul 7,25 propus de Darell şi colab. (5). S-au calculat şi rapoartele hidroxi-prolină/proteină (mg/g) şi hidroxi-prolină/triptofan (mg/mg) care dau indicaţii semnificative cu privire la valoarea biologică a proteinelor musculare. În acelaşi scop s-a calculat şi indicele lui Oser (Index of EAA, essential amino acids).

S-au determinat de asemenea și aminoacizii liberi, care alături de unele nucleotide și baze azotate, contribuie la formarea gustului și a palatabilității cărnii. În acest scop aminoacizii au fost extrași pînă la epuizare completă cu alcool etilic 80°.

Extrasul se evapora pe baie și apoi se delipida de mai multe ori cu eter etilic. Extracția cu alcool este preferabilă aceleia cu acid tricloracetic care favorizează blocarea aminoacizilor în coagulul proteic. După ce reziduul se lua cu apă distilată slab acidulată cu HCl se aducea la balon cotat. O alicotă se cromatografia pe hîrtie Whatman ca și în cazul aminoacizilor totali.

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Conținutul în aminoacizi totali din mușchi aparținînd regiunilor comerciale amintite (cotlet și jambon) provenind de la porci sănătoși și de la cei cu miopatie exudativă (PSE) este redat în tabelul 1.

Tabelul 1

Conținutul în aminoacizi totali din carnea porcilor sănătoși și cu miopatie exudativă, valori medii (g %carne umedă)

Amino Acidul	m. Longissimus dorsi		m. semitendinosus m. semimembranosus	
	normal	P.S.E.	normal	P.S.E.
Cys+Cys—Cys	0,75	0,35	0,80	0,25
Lys	0,50	0,40	0,65	0,45
His	0,50	0,30	0,55	0,35
Arg	1,90	0,72	1,70	1,55
Asp	1,25	0,90	0,80	0,25
Ser	2,20	1,25	2,75	1,50
Gly	1,50	0,78	1,35	0,90
Glu	3,20	2,50	3,30	2,90
Thre	1,35	0,60	1,25	0,90
Ala	2,40	1,70	2,40	1,95
Tyr	0,55	0,40	0,70	0,55
Met	0,65	0,30	0,50	0,35
Val	1,75	1,25	1,65	1,45
Phe	0,80	0,25	0,60	0,40
Leu	3,40	2,60	3,30	3,30
Try	0,23	0,19	0,21	0,18
HOPro	0,041	0,077	0,029	0,052

Datele din acest tabel și următoarele (tabelele 2, 3, 4) provin din analiza cărnii a 50 porci normali sănătoși și a 50 porci cu miopatie exudativă recoltați după sacrificare la Abatorul București și Timișoara. Animalele erau de rasa Landrace (metiși) avînd greutatea de 90—110 kg la tăiere. Diferențele constatate au fost statistic semnificative cu P 0,01—0,001.

Se observă că procentul aminoacizilor totali din carnea porcilor cu miopatie exudativă scade în comparație cu acela al porcilor sănătoși. Scăderea depinde și de tipul mușchiului. Astfel Arg, Ala, Leu și Phe scad mai ales în mușchiul Longiss. dorsi pe cînd Asp scade mai mult în m. semimembranosus și în m. semitendinosus.

În tabelul 2 este arătată variația conținutului în aminoacizi din cazul mușchiului Longiss. dorsi cel mai apreciat din punct de vedere comercial.

Tabelul 2

Conținutul în aminoacizi totali din carnea porcilor sănătoși și cu miopatie exudativă (raportat la g% proteină)

Amino Acidul	m. Longissimus dorsi			
	Normal		P.S.E.	
	media	limite	media	limite
Cys	1,54	1,39 – 1,91	1,57	0,88 – 2,77
Cys – Cys	2,13	1,87 – 2,44		
Lys	2,73	2,31 – 3,34	2,02	1,75 – 2,22
His	2,37	1,85 – 2,80	1,53	1,22 – 1,96
Arg	8,52	7,86 – 9,91	5,78	0,88 – 7,45
Asp	5,92	5,55 – 6,20	4,52	1,75 – 6,65
Ser	11,58	9,81 – 14,80	7,58	2,63 – 10,94
Gly	6,75	5,73 – 7,31	4,03	2,19 – 5,54
Glu	15,40	14,80 – 16,58	12,95	5,70 – 17,62
Thre	6,15	5,61 – 6,94	3,48	1,31 – 4,86
Ala	11,37	10,28 – 12,03	8,62	3,51 – 10,94
Tyr	2,97	2,34 – 3,41	2,41	0,88 – 3,32
Met	2,84	2,44 – 3,27	1,52	1,22 – 1,71
Val	8,05	7,16 – 8,78	6,50	2,19 – 9,12
Phe	3,30	2,44 – 4,16	1,45	0,88 – 1,82
Leu	15,87	15,27 – 16,58	13,97	6,13 – 17,62
Try	1,05	0,99 – 1,12	1,00	0,79 – 1,43
HoPro	0,167	0,11 – 0,231	0,323	0,243 – 0,390

Se remarcă în special scăderea masivă a Phe și creșterea procentului de hidroxi prolină. În tabelul 3 este redat modul cum se modifică conținutul în aminoacizi atît la animalele bolnave cît și la cele sănătoase. Subliniem în special scăderea Thre, Ala și Val la animalele cu miopatie exudativă. Alți aminoacizi ca : Cys-Cys, His, Arg, Asp, Glu prezintă cantități mai crescute față de acelea din carnea animalelor sănă-

Tabelul 3

Conținutul în aminoacizi liberi din carnea porcilor sănătoși și cu miopatie exudativă (mg% carne umedă)

Amino Acidul	m. Longissimus dorsi		m. semitendinosus m. semimembranosus	
	normal	P.S.E.	normal	P.S.E.
Cys	0,40	0,36	0,80	0,80
Cys – Cys	0,80	1,50	0,60	4,00
Lys	3,20	1,40	3,80	4,00
His	1,50	2,40	1,20	2,80
Arg	1,40	1,80	1,20	2,80
Asp	2,20	4,40	2,80	8,36
Ser	7,03	6,22	12,40	9,12
Gly	4,92	2,80	7,40	4,20
Glu	4,92	5,54	7,40	9,72
Thre	7,60	2,60	6,96	2,80
Ala	28,40	14,71	35,04	25,16
Tyr	4,40	1,80	5,20	1,60
Met	2,60	2,20	1,60	2,80
Val	3,80	1,70	4,40	2,00
Try	4,40	1,20	3,40	1,20
Phe	1,40	1,20	2,20	2,20
Leu	8,39	6,48	8,36	9,82

toase. Această variație în ambele sensuri ar putea explica rezultatele lui Serban și col. (6) care dozînd aminoacizii liberi în bloc găsește cînd o creștere cînd o scădere, pe care o atribuie erorilor experimentale sau metabolismului diferit al tipurilor de mușchi proveniți de la animalele cu miopatie exudativă.

În tabelul 4 sînt redate și valorile altor constante biochimice ale mușchilor PSE comparativ cu acelea provenind de la mușchii normali și care scot în evidență deosebirea dintre animalele bolnave și cele sănătoase.

Tabelul 4

Valoarea unor indici biochimici din carnea porcilor sănătoși și cu miopatie exudativă

Indice Biochimic	m. Longissimus dorsi		m. semitendinosus m. semimembranosus	
	normal	P.S.E.	normal	P.S.E.
	media		media	
pH la 6 ore de la sacrificare	6,05	4,99	6,05	5,12
amoniac mg%	22,00	39,50	21,50	39,50
proteină g%	21,51	19,42	20,73	23,11
hidroxi-prolină mg%	41,12	77,19	29,38	51,78
colagen mg%	298,12	559,62	213,00	376,09
HOPro/proteină mg/g	1,95	3,97	1,42	2,24
HOPro/Try mg/mg	0,185	0,373	0,139	0,272

Indicele OSER (E.A.A.Index)

carne normală media ; 84,62 ; limite ;82,05 – 87,77
carne P.S.E. media ; 53,19 ; limite: 29,15 – 61,00

Se constată astfel că valorile pH-ul scad mult la 6 ore de la sacrificarea animalelor cu PSE (valori între 4,99—5,12), iar amoniacul liber și ușor hidrolizabil crește în medie la 39,50 mg% comparativ cu 22,0 mg% la animalele sănătoase. Datele din tabelul 4 confirmă observațiile noastre anterioare (1) că în carnea PSE cantitatea de hidroxi-prolină și deci colagenul, crește.

Procentul mai ridicat de amoniac poate fi explicat prin necesitatea de a se neutraliza acidul lactic în exces. El provine din desaminarea acidului inosinic conform schemei propusă de Hamm (7), datorită excesului de AMP care rezultă din degradarea rapidă a ATP-ului, activității crescute a adenilat desaminazei precum și cantității sporite de histidină și arginină. Acești aminoacizi bazici se desaminează ușor în condițiile tehnicii de lucru din cursul determinării amoniacului.

Modificările conținutului în aminoacizi totali atrage după sine și variația unor enzime, așa cum s-a constatat dealtfel în cazul ATP-azei de diferite tipuri, creatin-fosfokinazei, lacticodehidrogenazei (8), ceea ce provoacă o deviere a metabolismului glucidic. Se produce în consecință o diminuare a intensității fosforilării oxidative și deci a sintezei ATP-lui, inhibitor allosteric al fosfofructo-kinazei, enzimă cheie în reglementarea glicolizei.

Date interesante în procesul fosforilării oxidative în cursul acestui sindrom au fost aduse de Eikelenboom (9) și de Brooks și Cassens (10).

Încorporarea diferită a aminoacizilor în lanțurile polipeptidice ale proteinelor musculare pledează pentru o cauză de natură genetică a sin-

dromului specific PSE la porcii stress susceptibili. Ipoteza este plauzibilă avînd în vedere faptul că această afecţiune se întîlneşte mai ales la animalele care au făcut obiectul unui proces de selecţie intensiv în scopul dezvoltării masei musculare în detrimentul ţesutului adipos. În sprijinul acestei păreri este şi recenta observaţie cu privire la devierea raportului ARN/ADN în carnea provenind de la animalele cu miopatie exudativă.

Pentru evaluarea valorii biologice a proteinelor din carnea PSE s-a calculat şi indicele Oser. Valoarea lui oscilează între limitele 82,05—87,77 (media 84,62) pentru carnea provenind de la animale sănătoase şi între 29,15—61,00 (media 53, 19) pentru carnea PSE. Valoarea mai scăzută în cazul cărnii PSE este explicabilă datorită scăderii aminoacizilor esenţiali şi sporirii de ţesut conjuctiv.

CONCLUZII

1. Conţinutul în aminoacizi totali din carnea porcilor cu miopatie exudativă (carne PSE) scade cu excepţia hidroxiprolinei care creşte. Scăderea variază cu felul muşchiului.

2. Aminoacizii liberi din carnea PSE scad în general cu excepţia: cistinei, histidinei, argininei, acidului aspartic şi acidului glutamic, care cresc.

3. Amoniacul (liber şi cel uşor hidrolizabil) creşte în carnea PSE ceea ce poate explica modificările de gust ale cărnii provenind de la animalele cu miopatie exudativă.

4. Indicele Oser (EAA Index) este scăzut la carnea PSE ceea ce arată că valoarea biologică este mai mică decît la carnea normală.

5. Modificarea conţinutului în aminoacizi la carnea PSE sprijină ipoteza că miopatia exudativă a porcilor este o maladie de natură genetică.

Prezentat la redacţie
la 30 iunie 1975

Facultatea de medicină veterinară
Laboratorul de biochimie Bucureşti

FURTHER OBSERVATIONS ON THE BIOCHEMICAL MODIFICATIONS IN THE EXUDATIVE MYOPATHY OF SWINE

SUMMARY

The intensive rearing of swine is associated with a higher frequency of the occurrence of porcine stress syndrome (PSS).

This affection produces a biological and technological modification of meat qualities known as PSE (pale, soft, exudative meat) and DFD (dark, firm, dry meat). The determination of the bound and free amino acids has shown important modifications. The quantity of bound amino acids diminishes, excepting the hydroxyproline which increases. In the case of free amino acids some of them diminish too and others such as:

cystine, lysine, arginine, histidine, aspartic acid and glutamic acid, increase. These variations depend on the muscle type. The ammonia increases also in the fresh slaughtered PSE meat. The biological value appreciated by the EAA index (essential amino acids index of Oser) decreases. The modifications observed support, in the authors'opinion, the theory of the genetic origin of PSS.

BIBLIOGRAFIE

1. L. M. Buruiană, D. Curcă, M. D. Mihai, *Variația colagenului polimeric în miopatia exudativă a porcilor.* Com. Simpozionul de Biochimie al Academiei R.S.R. 21—22 Vi. 1974.
2. L. M. Buruiană, M. Petculescu, *Polyacrylamid gel electrophoresis of meat extracts from swine with exudative myopathy.* Com. XX-th World Veterinary Congress. July 6—12, 1975, Thessaloniki.
3. M. X. Sullivan, W. C. Hess, J. Biol. Chem., 1955, 441, (1944).
4. R. E. Neuman, M. A. Logan, J. Biol. Chem. 184, 299, (1950).
5. G. E. Darell, R. W. Bray, W. G. Hoekstra, J. Food. Sci. **28**, 503, (1963).
6. M. Serban, D. Cotariu, Gh. Dănicel, C. Iordache, N. Moldovanu, C. Medeşan, Tr. Benţea, St. cerc. Biochim. **16**, 429, (197ɔ).
7. R. Hamm, Fleischwirtschaft. **2**, 206, (1972).
8. J. Charpentier, R. Goutefoungea, World Rev. Animal Sci. **VIII**, 44, (1972).
9. G. Eikelenboom, *Stress susceptibility in swine and its relationship with energy metabolism in skeletal musculature.* THESIS of Schoonoord Institute, Netherlands, (1972).
10. G. A. Brooks, R. G. Cassens, J. Anim. Sci. **37**, 688, (1973).

ST. CERC. BIOCHIM., 19, 1, 33–37, (1976)

REPARTIȚIA PEROXIDAZEI ÎN DIFERITE ORGANE ALE PLANTEI DE TUTUN (*NICOTIANA TABACUM L.*) ȘI PURIFICAREA EI DIN MĂDUVA TULPINII*

MARGARETA DUMITRESCU, HORST D. SCHELL, MIRCEA A. MATEESCU

Rezumat. — În extractele obținute din planta de tutun activitatea peroxidazică variază în funcție de organele și țesuturile studiate. Activitatea specifică maximă s-a putut observa la extractele obținute din lemn și măduvă, iar cea mai mică la extractele din frunze. Activitatea peroxidazică a extractelor din epidermă și rădăcină se situează între cele două limite. Măduva tulpinii, ușor de prelucrat, s-a dovedit o sursă demnă de luat în considerare pentru obținerea și purificarea de peroxidază din planta studiată. Prin precipitări fracționate cu sulfat de amoniu și cromatografie pe Sephadex G-50 Medium se obține un preparat înalt purificat de peroxidază (factor de purificare 110).

Peroxidaza (EC 1.11.1.7) este una din enzimele care prezintă interes atît pentru cercetarea fundamentală cît și mai ales pentru o serie de aplicații practice în chimia analitică, preparativă și în alte domenii. Sursa principală de obținere a acestei enzime este în prezent rădăcina de hrean (*Armoracia rusticana L.*) (1)

În vederea găsirii unor surse mai economice pentru obținerea peroxidazei din material vegetal, ne-am îndreptat atenția spre *Nicotiana tabacum L.*, cunoscut fiind faptul că această plantă posedă activități peroxidazice relativ crescute și că, după recoltarea frunzelor pentru fabricarea tutunului, mai rămîne o cantitate apreciabilă de material vegetal nevalorificat. În acest scop, am studiat în lucrarea de față activitatea peroxidazică în extractele obținute din diferite organe și țesuturi ale acestei plante, pentru a detecta părțile cu activitate peroxidazică ridicată, care ar putea servi ca sursă de obținere a unor preparate de peroxidază cu activitate catalitică crescută.

Problema repartizării peroxidaziei în diferite organe și țesuturi animale (2), (3), (4) și vegetale (5), (6), prezintă un deosebit interes teoretic și practic. Deși *Nicotiana tabacum* a fost abordată sub acest aspect (7), (8), (9) totuși problema rămîne încă deschisă, mai ales din punct de vedere preparativ.

MATERIAL ȘI METODE

În cercetările noastre am folosit plante mature de *Nicotiana tabacum* de la care s-au recoltat rădăcini, tulpini și frunze. În cazul tulpinilor s-a lucrat separat pe epidermă, lemn (scoarță și periciclu) și măduvă. Per-

* Asist. tehnică : A. Tiurbe

oxidaza a fost extrasă cu o soluție de tampon acetat 0,01 M, pH 4,7, folosind la extracție, în cazul frunzelor, epidermei și măduvei, la 10 g de material vegetal fin mărunțit 25 ml soluție tampon, iar în cazul lemnului și al rădăcinii, 50 ml. După 24 ore de repaos la 3—4°C și o prealabilă filtrare sau centrifugare s-a dozat activitatea peroxidazică a extractelor obținute. În cazul frunzelor și măduvei activitatea peroxidazică a fost determinată și în sucurile plasmatice și vacuolare obținute prin stoarcerea materialului vegetal într-o presă Hafico (R.F.G.) la 200 atm (10). Concentrația proteică a extractelor și sucurilor a fost determinată spectrofotometric la 280 nm.

Determinarea activității peroxidazice în extractele și sucurile obținute a fost efectuată după metoda indicată de Brad și colab. (11).

Analiza electroforetică s-a efectuat în gel de poliacrilamidă 7,5 % la 4°C, în tampon TRIS-borat, pH 8,2, la o tensiune de 180 V/tub și o intensitate de 5 mA/tub. Durata de migrare 90 min. Developarea electroforegramelor s-a făcut cu un reactiv specific pentru peroxidază, format dintr-un amestec de benzidină, acetat de sodiu și apă oxigenată (12). Colorarea proteinelor s-a făcut cu o soluție de Amidoschwarz 0,1 %. Purificarea extractului proteic total din măduvă a fost realizată prin precipitări fracționate cu sulfat de amoniu (o primă fracționare cu sulfat de amoniu pînă la o saturare de 25 % și următoarea pînă la 90 %). Precipitatul a fost reluat în tampon acid acetic acetat 0,01 M pH 4,7 și trecut pe o coloană de Sephadex G 50 medium (40 × 1,5 cm) echilibrată în același tampon, dar care conținea și NaCl 0,1 M care a fost folosit și drept eluent.

REZULTATE ȘI DISCUȚII

După cum rezultă din tabela 1, activitatea peroxidazică variază în funcție de organul și țesutul folosit.

Întrucît măduva, spre deosebire de lemn, nu prezintă dificultăți în cursul prelucrării pentru obținerea de sucuri și extracte — datorită consistenței sale — ne-am îndreptat atenția mai ales asupra acestei părți ale plantei.

Tabela 1

Activitatea peroxidazică din extractele diferitelor organe și țesuturi ale plantei de tutun

Nr. crt.	Organ sau țesut	Concentrația proteică (mg/ml)	Activitatea enzimatică (μmoli ascorbat oxidat/ min/ml)	Activitatea specifică (μmoli ascorbat oxidat/ min/mg proteină)
1	Frunză	37,0	35,5	0,96
2	Epidermă	30,0	102,0	2,85
3	Lemn (scoarță+periciclu)	0,5	3,4	6,80
4	Măduvă	4,5	27,2	6,05
5	Rădăcină	13,0	42,0	3,23

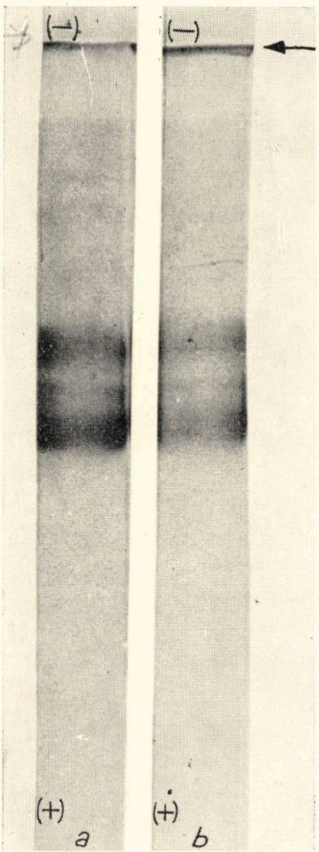


Fig. 1. — Zimogramele peroxidazei din extractul de măduvă (*a*) și din amestecul de suc plasmatic și vacuolar al măduvei (*b*) în urma electroforezei în gel de poliacrilamidă.

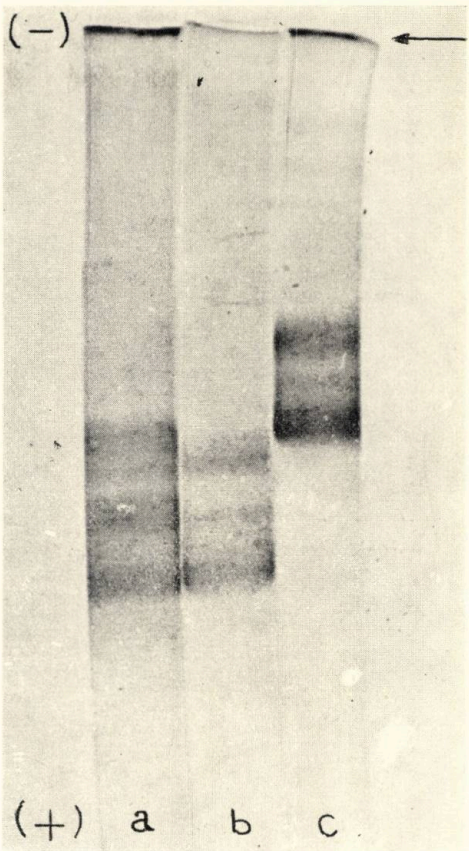


Fig. 2. — Zimogramele peroxidazei din extractele epidermei (*a*), lemnului (*b*) și măduvei (*c*) ale plantei de tutun.

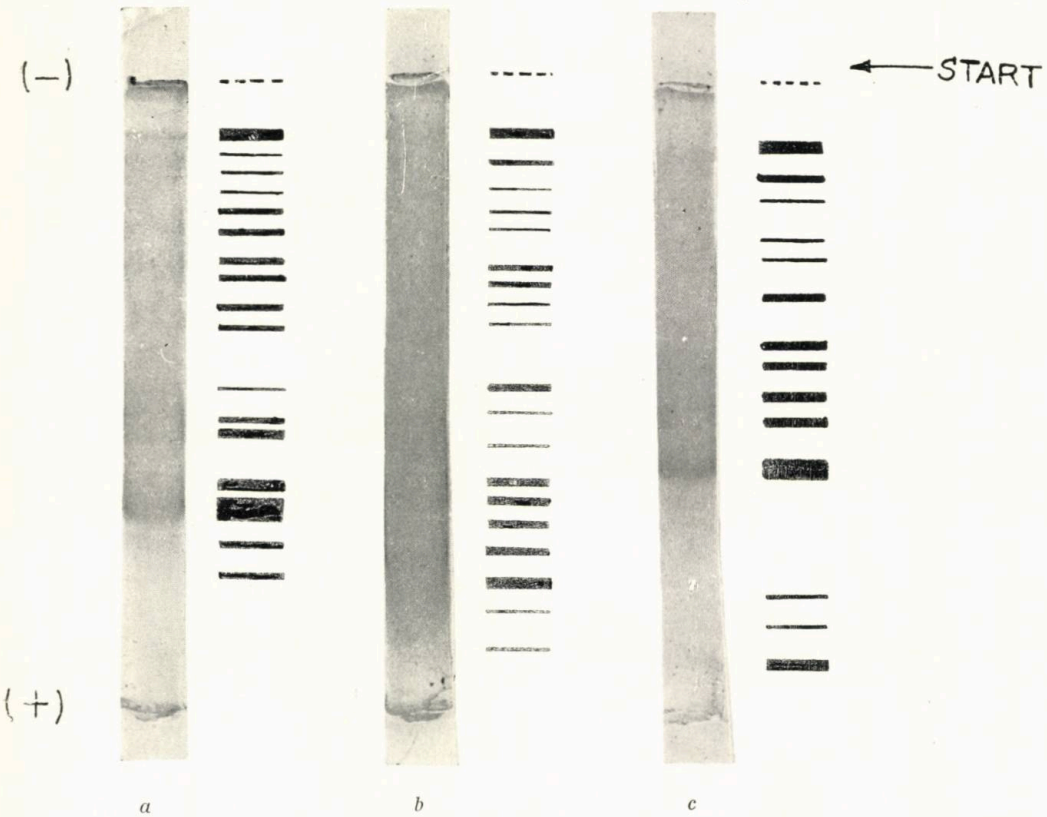


Fig. 3. — Zimogramele peroxidazei din extractele diferitelor organe ale plantei de tutun : *a*) rădăcină ; *b*) frunză ; *c*) măduvă.

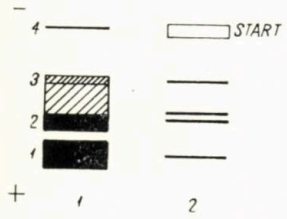


Fig. 4. — Electroforegramele extractului purificat : *1*. izoenzime peroxidazice (activitate în prezență de benzidină și H_2O_2) ; *2*. proteine (colorare cu Amidoschwarz)

Analizînd activitatea enzimatică a sucurilor vacuolare și plasmatice, precum și a extractului din măduvă, se constată următoarele : în timp ce extractul obținut în tampon acetat (0,01 M, pH 4,7) posedă o activitate enzimatică de 27,2 μMoli ascorbat oxidat/min/ml extract, valoarea găsită în sucul vacuolar este 42, iar la cel plasmatic chiar 92 (tabela 2).

Tabela 2

Variația activității peroxidazice din măduva tulpinii de tutun în funcție de modul de extracție

Nr. crt.	Modul de extracție	Concentrația proteică (mg/ml)	Activitatea enzimatică (μmoli ascorbat oxidat /min/ml)	Activitatea specifică (μmoli ascorbat oxidat/ min/mg proteină)
1	Extract în tampon acetat	4,5	27,2	6,05
2	Suc vacuolar	23,0	42,0	1,82
3	Suc plasmatic	35,0	92,0	2,62

Rezultatele obținute la analiza electroforetică în gel de poliacrilamidă a extractului și a amestecului de sucuri plasmatice și vacuolare indică prezența acelorași fracții cu activitate peroxidazică în cele două probe din măduvă (fig. 1),

Pentru a primi o privire de ansamblu asupra conținutului în fracțiuni proteice cu activitate peroxidazică ale măduvei, în comparație și cu celelalte părți ale tulpinii, s-au supus analizei electroforetice, pe lîngă extractul măduvei, și extractele din epiderm și lemn. Zimogramele obținute (fig. 2) indică variații de la țesut la țesut. Astfel, în timp ce în cazul epidermei se constată 7 fracțiuni bine delimitate, cu viteze de migrare electroforetică relativ mare, la lemn se observă doar 5 fracțiuni cu viteză de migrare similară. Zimograma măduvei este net diferită de acelea ale epidermei și lemnului. Se constată în acest caz prezența a numai 3 fracții peroxidazice bine delimitate, cu viteze de migrare electroforetică considerabil mai reduse, fapt care s-ar putea datora unui reglaj genetic diferențiat pe diferite structuri ale plantei, în funcție de rolul metabolic ale acestora.

Diferențe calitative s-au putut pune în evidență și între zimograma extractelor de măduvă și cele de rădăcină și frunză (fig. 3). Se observă o oarecare asemănare între zimogramele obținute din rădăcină și frunze, cu cele ale epidermei și lemnului, prezentînd un grup de fracții bine delimitate, cu o mobilitate electroforetică ridicată, spre deosebire de măduvă, unde acest grup de fracții se observă de asemenea, dar care posedă o mobilitate electroforetică mai mică.

În cazul zimogramei de frunză se constată totodată numărul cel mai mare de fracțiuni peroxidazice active, fapt care poate sta în strînsă legătură cu funcțiile multiple ale frunzei. O asemănare relativ mare se constată în cazul tuturor organelor studiate la nivelul fracțiilor peroxidazice active cu viteză de migrare electroforetică mică.

Rezultatele obţinute justifică alegerea măduvei tulpinii plantelor de tutun ca material iniţial pentru purificarea enzimei. Astfel lucrînd pe plante de tutun obţinute de la I.C.I.C.A. prin amabilitatea dr.N. Aniţia, am obţinut un preparat enzimatic înalt purificat (factor de purificare 110), după cum se observă în tabela 3.

Tabela 3

Fazele de purificare a peroxidazei din măduva tulpinii plantei de tutun

Faza de purificare	Activitatea enzimatică (μmoli ascorbat oxidat/ min/ml probă)	Concentraţia proteică (mg proteină/ml probă)	Activitatea specifică (μmoli ascorbat oxidat/ min/mg proteină)	Factor de purificare
Extract proteic total	6,28	4,0	1,57	1,0
Precipitare cu $(NH_4)_2SO_4$ 25% saturare	6,92	3,2	2,16	1,4
Precipitare cu $(NH_4)_2SO_4$ 90% saturare	10,97	5,6	19,58	12,5
Cromatografie pe Sephadex G-50 Medium	26,0	0,15	173,33	110,4

Prin trecerea pe coloana de Sephadex a preparatului parţial purificat prin fracţionări cu sulfat de amoniu, se constată prezenţa unui prim pisc bine definit cu activitate enzimatică urmat de alte fracţii de proteine inactive enzimatic. Supunînd analizei electroforetice fracţia corespunzătoare primului pisc, nu se constată alte fracţii proteice în afara celor cu activitate enzimatică, după cum se vede în figura 4.

CONCLUZII

1. Toate organele şi ţesuturile studiate de la *Nicotiana tabacum* prezintă o activitate peroxidazică mai mult sau mai puţin intensă, în funcţie de partea folosită a plantei.

2. Zimogramele obţinute variază în funcţie de organele şi ţesuturile studiate, frunza prezentînd zimograma cea mai complexă, iar măduva fracţiuni peroxidazice cu mobilităţile electroforetice cele mai reduse.

3. Măduva tulpinii de tutun, uşor de prelucrat, s-a dovedit o sursă utilă pentru obţinerea şi purificarea de peroxidază.

4. Prin precipitări fracţionate cu sulfat de amoniu şi cromatografie pe Sephadex G-50 Medium, s-a obţinut un preparat înalt purificat de peroxidază (factor de purificare 110).

Prezentat la redacţie
la 30 octombrie 1974

Institutul de ştiinţe biologice
Bucureşti, Laboratorul de taxonomie
şi evoluţia animalelor
Departamentul de biochimie

PEROXIDASE DISTRIBUTION IN DIFFERENT ORGANS OF (*NICOTIANA TABACUM* L.) AND ITS PURIFICATION FROM THE STEM PITH

SUMMARY

Peroxidase activity in the extracts obtained from the tobacco plants is variable, depending on the plant organs and tissues. The maximum specific activity was recorded in the extracts obtained from the tobacco stem wood and pith and the minimum one in the leaf extracts. The stem epiderm and root peroxidase activity is situated between these two limits.

The stem pith of the tobacco plants is easy to be processed and proved to be a worthy source for peroxidase purification. A highly purified peroxidase preparation (110 purity factor) was obtained by ammonium sulfate fractionated precipitation and column chromatography on Sephadex G-50 Medium.

BIBLIOGRAFIE

1. B. C. Saunders, A. G. Holmes-Siddle, B. P. Stark, *Peroxidase*, London, Butterworths, 1964.
2. I. Huszak, Biochem. J., **312**, 330 (1942).
3. W. G. Heim, D. Appelman, H. T. Pyfrom, Amer. J. Physiol., **186**, 19 (1956).
4. G. Bancroft, K. A. C. Elliott, Biochem. J., **28**, 1911 (1934).
5. E. F. Hartree, in *Modern Methods of Plant Analysis*, editat de Paech and Tracey, Springer Verlag, Berlin, 1955, vol. IV, p. 231.
6. H. F. Stafford, S. Bradvinder, Plant Physiol., **49**, 950 (1972).
7. Sheen S. J., Evolution, **26**, 143 (1972).
8. Sheen S. J., Phytochemistry **8**, 1839 (1969).
9. Rucker W., Radola B. J., Planta 99, 192 (1971).
10. E. Macovschi, *Natura și structura materiei vii*, Ed. Acad. R.S.R., București, 1972.
11. I. Brad, Gh. Olteanu, Z. Marcu, St. cerc. biochim., **12**, 323 (1969).
12. K. K. Pandey, Nature, **215**, 5077 (1967).

ST. CERC. BIOCHIM., 19, 1, 39–42 (1976)

CONTRIBUȚII LA VALORIFICAREA AGARULUI DIN ALGA *CERAMIUM RUBRUM* (HUDS.) AG. DE PE LITORALUL ROMÂNESC AL MĂRII NEGRE

A. GHEORGHIU, ELENA IONESCU-MATIU, I. CĂRĂUȘU

Rezumat. Autorii au obținut un produs care, analizat în comparație cu agarul, a prezentat proprietăți, reacții de identificare și condiții de puritate similare, încadrîndu-se în prevederile farmacopeelor, ca agar. Conținutul de 35,64% agar găsit în această algă roșie, față de conținutul în agar de pînă la 40% din unele specii de alge din genurile Gelidium, Gracillaria și Pterocladia, cu însemnătate deosebită, poate justifica eforturi în vederea valorificării și a acestei alge marine, contribuind astfel la o judicioasă valorificare a resurselor naționale.

Între statele care valorifică agarul, produs obținut din anumite alge roșii se înscriu Japonia, Peninsula Coreea, S.U.A., Noua Zeelandă, partea de sud a Africii Spania și U.R.S.S. (1).

Din punct de vedere chimic se știe că agarul este format din două componente principale distincte *agaropectina*, polizaharid bogat în grupări polare (acid D-glucuronic, piruvic, grupări sulfat) și *agaroză*, polizaharid lipsit practic de astfel de grupări (neutru) și care este un copolimer al D-galactozei și 3,6-anhidro-L-galactozei.

Acest compus macromolecular natural s-a impus prin proprietățile sale reologice în cele mai variate domenii din care reținem industria ușoară, industria alimentară, cosmetică, medicină și farmacie (2–6).

În Farmacopei (7)–(13) se prevede că agarul este un produs obținut din diferite specii de alge roșii (Rhodophyceae) din genurile Gelidium, Gracillaria, Eucheuma, Ahnfelitia, Pterocladia, Phyllophora, iar Farmacopeea Jugoslavă (13) îl indică și în speciile din genul Ceramium.

Cantitatea de alge roșii existentă în Marea Neagră se ridică la 10 000 000 de tone (2). În urma prospecțiunilor întreprinse de cercetătorii români (14), biomasa determinată de algele roșii de pe litoralul românesc variază între 16 și 86 t/ha, cantități disponibile pentru recoltare care practic sînt inepuizabile. Din inventarul întocmit (15) — (17) cu privire la distribuția algelor macrofite de-a lungul litoralului românesc al Mării Negre rezultă că și speciile din genul Ceramium (C. rubrum (Huds.) Ag., C. cireinatum (Kütz). J. Ag., C. corticatum Kylin ; C. diaphanum (Lightf) Roth ; C. elegans Duchez ; C. pedicellatum (Duby) J. Ag. din familia Ceramiaceae, Ord. Ceramiales Rhodophyta sînt mult răspîndite. Cerumium rubrum (Huds.) Ag. se găsește în dreptul stațiunilor Mamaia, Agigea, Eforie N., Eforie S., Tuzla, Costinești, Comorova, Mangalia și Vama Veche, în cantități care pot fi valorificate ca atare sau extinse în culturi.

În lumina datelor obținute pînă acum, am socotit necesar să extindem cercetările asupra lui Ceramium rubrum (Huds.) Ag. de pe litoralul românesc al Mării Negre, în vederea unei eventuale valorificări a acestei alge roșii.

MATERIAL ȘI METODE

Materialul*, care a servit cercetătorilor noastre a fost colectat în luna iulie din dreptul staţiunilor Agigea, Eforie N. şi Eforie S. Alga după recoltare a fost uscată la soare în scopul decolorării. Ulterior a fost spălată pentru eliminarea pigmenţilor, reuscată la aer, mărunţită şi tratată cu apă (timp de 24 ore). Soluţiile apoase reziduale cu cantităţi importante de săruri şi impurităţi au fost îndepărtate, 500 g algă uscată cu o umiditate de 15%, a fost supusă extracţiei cu apă în autoclav la 90° timp de 12 ore. Extractul fierbinte s-a filtrat şi s-a depozitat într-un vas colector închis, unde prin răcire soluţia s-a transformat în gel. Produsul astfel obţinut a fost tăiat în bucăţi şi introdus în vase la temperatura de (—10°C), timp de două zile. Prin operaţiunea de dezgheţare, efectuată în recipiente încălzite (+10°C) s-a eliminat apa şi produsul s-a obţinut sub formă de „fulgi". Deshidratarea produsului s-a realizat prin filtrare sub vacuum. Pentru decolorarea „fulgilor" s-a utilizat o soluţie de hipoclorit de sodiu (1%). Produsul obţinut a fost uscat într-un curent de aer cald şi analizat în comparaţie cu agarul după indicaţiile prevăzute în farmacopei (9), (12).

REZULTATE ȘI DISCUȚII

În urma aplicării procedeului descris, am găsit în alga roşie Ceramium rubrum (Huds.) Ag. un conţinut de 35,64g% produs cu umiditate de 20%. Produsul uscat este sfărămicios, umed este elastic; insolubil în apă rece sau alcool; în proporţie de 1% în apă la cald (80—100°C) este aproape complet solubil, prin răcire se obţine un gel transparent slab colorat, cu reacţie neutră, gust mucilaginos.

REACȚIE DE IDENTIFICARE

Tratînd 3 ml soluţie 1% cu 3—4 picături de iod 0,1 N se obţine în zona de contact o coloraţie violetă, iar la agitare lichidul se colorează în galben deschis pînă la galben-brun deschis.

GELIFICAREA ȘI LICHEFIEREA CONDIȚIE DE PURITATE

50 ml soluţie 1% răciţi între 35—30°C, formează un gel tare, rezistent, care devine lichid la temperatura de 80°C.

ALCALINITATE, ACIDITATE, CONDIȚIE DE PURITATE

10 ml soluţie 1% se amestecă cu 10 ml apă şi se adaugă o picătură de roşu de metil (indicator); soluţia se colorează în galben, iar la adăugarea unei picături de acid clorhidric 0,1 N se colorează în roz.

* Pentru identificarea unei părţi din materialul colectat, aducem cu această ocazie mulţumiri algologului Maria Standniciuc de la Institutul Român de cercetări marine, Constanţa.

DETERMINAREA FACTORULUI DE ÎMBIBARE

5 g produs mărunţit s-a pus într-un cilindru gradat de 100 ml cu dop rodat, s-a completat cu apă la semn, s-a agitat de cîteva ori şi s-a lăsat în repaus la 25° C timp de 24 ore. La filtrare într-un cilindru gradat de 100 ml, prin vată de sticlă umezită în prealabil, s-a obţinut 75 ml apă.

De asemenea au mai fost determinate din acest produs :

Impurităţi insolubile în apă fierbinte	0,8 %
Pierderea prin uscare	20,0 %
Cenuşă totală	4,0 %
Cenuşă insolubilă în acid clorhidric diluat	0,7 %

Din analiza efectuată rezultă că produsul obţinut de noi din alga roşie Ceramium rubrum (Huds.) Ag. în comparaţie cu agarul a prezentat proprietăţi, reacţii de identificare şi condiţii de puritate similare încadrîndu-se în prevederile farmacopeelor, ca agar.

CONCLUZII

Din alga roşie Ceramium rubrum (Huds.) Ag. colectată de pe litoralul românesc al Mării Negre se poate obţine un produs care, analizat în comparaţie cu agarul prezintă proprietăţi, reacţii de identificare şi condiţii de puritate similare, încadrîndu-se în prevederile farmacopeelor, ca agar.

Conţinutul de 35,64 g % agar găsit în această algă roşie faţă de conţinutul în agar de pînă la 40 % din unele specii de alge menţionate din genurile : Gelidium, Gracillaria şi Pterocladia, cu însemnătate deosebită, poate justifica eforturi în vederea valorificării şi a acestei alge marine, contribuind astfel la o judicioasă valorificare a resurselor naţionale.

Prezentat la redacţie
la 1 octombrie 1974

Facultatea de farmacie Bucureşti
şi Staţiunea de cercetări biologice
„Stejarul" Pîngăraţi-Neamţ.

CONTRIBUTIONS TO THE VALORIZATION OF AGAR FROM ALGA *CERAMIUM RUBRUM* (HUDS.) AG. GROWING ON THE ROMANIAN BEACH OF THE BLACK SEA

SUMMARY

— The authors of this paper obtained a compound which, analysed against agar, revealed properties, identification reactions and similar purity conditions, fulfilling the provisions of some pharmacopoeias, as agar.

— The content of 35.64 g % agar found in this red alga, as compared to the agar content up to 40 % of some alga species belonging to various sorts, such as Gelidium, Gracillaria and Pterocladia of particular importance, can justify the efforts aiming at the valorization of this sea weed, thus contributing to a sensible valorization of our national resources.

BIBLIOGRAFIE

1. HOPPE A. H., Bot. Mar., **3**, 13 (1962).
2. SIMIONESCU CR., RUSAN VIORICA, POPA V., *Chimia algelor marine*, Edit. Acad. R.S.R., București, 1974, p. 202.
3. CHAPMAN V., *Morskie vodorosli i ih isopolizovanie*, traducere din limba engleză, Moscova, 1950.
4. L. KOSA, Gyogyszereszet, **5**, 361, (1961); C.A., **56**, 8855a (1962).
5. A. K. KHAN, Rhodes T.C. Pharm. Acta Helv., **47**, 153 (1972).
6. CIBA Rundschau, **1** (1969).
7. *Farmacopeea Română*, Ediția a VII-a, Editura medicală, București, 1956, p. 55.
8. *Österreichisches Arzneibuch*, IX. Österreichische Staatsdrukkerei Wien 1960, Band. I, p. 298.
9. *The Pharmacopeia of the United States of America* (U.S.P.), XVII, New York, 1965, p. 17.
10. *Pharmacopèe Francaise*, VIII[e] Édition Paris, 1965, p. 515.
11. *Hungarian Pharmacopoeia*, VI, Akadémiai Kiado-Budapest, 1972, vol. III, p. 9.
12. *Pharmacopea Helvetica*, Ediția VI, Tome II, 1971, p. 111.
13. *Farmakopeja* S. F. R. J. (Ph-Jug.), Ediția III, Vol. 2, 1972, A-550.
14. C. M. BĂCESCU, I. G. MÜLLER, T. M. GOMOIU, *Ecologia marină*, vol. IV Edit. Academiei, București, 1971, p. 102.
15. H. V. SKOLKA Rev. roum. de biol., Ser. Bot., **14**, 363, (1969).
16. I. TARNAVSCHI, M. OLTEANU, St. cerc. biol., ser. biol. veg., **10**, 269, 317 (1958).
17. G. I. MÜLLER, H. V. SKOLKA, N. BODEANU, *Hidrobiologia*, **10**, 279, (1969).

ST. CERC. BIOCHIM., 19, 1, 43–47 (1976)

EVIDENȚIEREA ȘI PURIFICAREA PARȚIALĂ A UNOR EXOGLICOZIDAZE (β-GALACTOZIDAZA, β-GLUCOZIDAZA, β-N-ACETILGLUCOZAMINIDAZA ȘI α-MANOZIDAZA) DIN *PHASEOLUS VULGARIS*

ECATERINA ILICA

Rezumat. — S-au purificat parțial patru glicozidaze din *Phaseolus vulgaris*, varietatea Great Northern. În urma germinării boabelor de fasole, a extracției în tampon citrat 0,2M pH = 6 și fracționării cu sulfat de amoniu, s-a obținut un extract glicozidazic. Extractul exoglicozidazic s-a cromatografiat pe DEAE-Sephadex A-50, obținînd o repartiție a enzimelor avantajoasă unei separări mai simple și într-o stare suficient de pură a β-galactozidazei și α-manozidazei.

Studiul degradării enzimatice a glicoproteinelor a impus găsirea unei surse accesibile și a unei posibilități de separare și purificare a glicozidazelor.

Enzimele glicozidazice sînt răspîndite la animale (1)—(5), microorganisme (6)—(8) și plante (9)—(14).

Existența glicozidazelor în fasole a fost sugerată de faptul că boabele de fasole sînt bogate în hemaglutinine, galactomanan, glucomanan și alte complexe polizaharidice care sînt degradate în timpul germinării (15)—(16).

Într-un extract apos de *Phaseolus vulgaris* s-au evidențiat următoarele enzime glicozidazice : β-N-acetilglucozaminidaza (β-2—acetamido 2—deoxi-β-glucozid-acetamidoglucohidrolaza) (EC.3.2.1.30), α-galactozidaza (α-D-galactozidgalactohidrolaza), β-galactozidaza (βD-galactozid galactohidrolaza) (EC.3.2.1.32), α-manozidaza (α-D-manozid manohidrolaza)(E.C.3.2.1.24) și β-D-glucozidaza (β-D-glucozid glucohidrolaza) (E.C. 3.2.1.21) a căror activitate enzimatică a crescut de 30 ori în cursul germinării (12).

În această lucrare ne-am propus evidențierea a patru glicozidaze și anume : β-galactozidaza, β-glucozidaza, β-N-acetilglucozaminidaza și α-manozidaza dintr-o varietate de *Phaseolus vulgaris* și o purificare parțială a lor. Pornind de la indicațiile lui Bahl și Agrawal (11), (12), am constatat încă din prima etapă de separare cromatografică o repartiție diferită a enzimelor pe curbă care s-ar putea datora folosirii unei varietăți diferite de fasole. Această repartiție prezintă o rezoluție mult mai bună în special pentru β-galactozidază și α-manozidază. În felul acesta este posibilă obținerea cantitativă, într-un mod relativ simplu, a celor două enzime într-o stare suficient de pură pentru a putea fi folosite în experiențele de degradare a glicoproteinelor.

MATERIAL ȘI METODE

Germinarea boabelor de fasole. S-a folosit varietatea Great Northern. Înainte de întrebuințare boabele de fasole s-au ținut 10 minute în apă

oxigenată 10%. S-au germinat 6 zile în plăci cu umiditate constantă la 26°C, la întuneric. Pentru extracţia enzimelor s-au folosit cotiledoanele.

Obţinerea extractului enzimatic. Toate operaţiile următoare s-au făcut la o temperatură în jur de 4°C.

Extracţia: 300 g cotiledoane spălate cu apă distilată şi uscate pe hîrtie de filtru, s-au trecut prin maşina de mărunţit material vegetal. S-au suspendat apoi în tampon citrat de sodiu 0,2M pH = 6 şi s-au omogenizat de 3 ori cîte 30 secunde cu o pauză de 30 secunde la 6 500 ture/minut. S-au folosit 528 ml tampon citrat de sodiu. Extracţia s-a făcut $2^1/_2$ ore şi a fost urmată de o centrifugare de 1 oră la 20 000 ture/minut. Supernatantul de 500 ml obţinut s-a păstrat, iar precipitatul s-a îndepărtat.

Fracţionarea cu sulfat de amoniu. Supernatantul s-a precipitat cu $(NH_4)_2SO_4$ pînă la o saturare de 65%. Precipitatul s-a reluat pînă la dizolvare în tampon citrat 0,2M pH = 6 şi s-a reprecipitat cu $(NH_4)_2SO_4$ la 65% saturare. Precipitatul redizolvat s-a precipitat la 100% saturare $(NH_4)_2SO_4$. Precipitatul final dizolvat în 132 ml tampon citrat 0,05 M pH = 4,6 considerat „extractul enzimatic" s-a dializat faţă de tampon citrat 0,05 M pH = 4,6. După dializă extractul enzimatic s-a repartizat în eprubete şi s-a păstrat îngheţat pînă la întrebuinţare.

Cromatografia pe DEAE-Sephadex A-50. S-a pregătit o coloană de DEAE-Sephadex A-50 de 2,5 × 40 cm. Coloana echilibrată iniţial cu tampon fosfat 0,04 M pH = 6,5 s-a încărcat cu 4 ml extract enzimatic (22 mg proteină) dializat faţă de acelaşi tampon fosfat 0,04 M pH = 6,5.

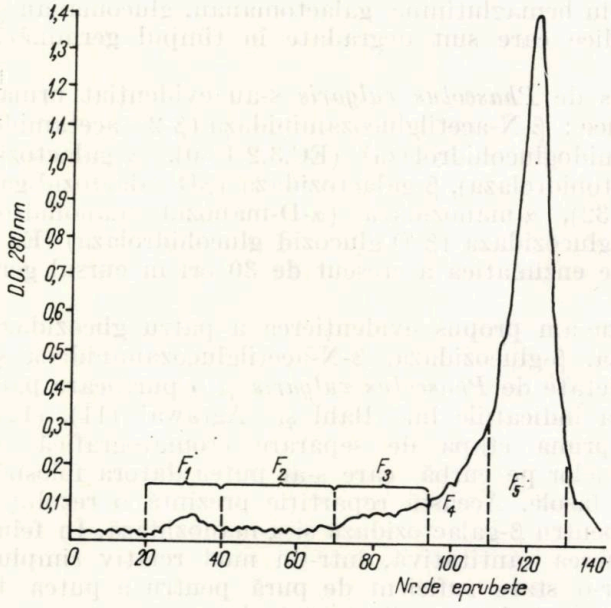


Fig. 1. — Profilul cromatografiei pe o coloană de DEAE-Sephadex A-50 (2,5 × 40 cm), echilibrată cu tampon fosfat 0,04 M pH = 6,5, eluată cu un gradient de 150 ml tampon fosfat 0,04 M pH = 7,5 şi 150 ml tampon fosfat 0,04 M pH = 7,5 cu 1M NaCl.

Coloana s-a eluat cu un gradient continuu între 150 ml tampon fosfat 0,04 M pH = 7,5 şi 150 ml NaCl 1M în acelaşi tampon. Condiţiile cromatografierii au fost următoarele: viteză de eluţie 60 ml/h, fracţiunile colectate de 2 ml/eprubetă. Concentraţiile proteice s-au citat la 280 nm şi s-a trasat cromatograma din fig. 1.

Determinarea activităţilor enzimatice. Activităţile enzimatice pentru fiecare enzimă în parte s-au determinat folosind o metodă a lui Findlay, Levvy şi Marsh (17) uşor modificată. Substratele folosite în concentraţie de 25 mM sînt următoarele : *p*-nitro-fenil-β-D-galactopiranozid pentru β-galactozidază, β-nitro-fenil-β-D-glucopiranozid pentru β-glucozidază, *p*-nitro-fenil-α-D-manopiranozid pentru α-manozidază, *p*-nitro-fenil-N-acetil-D-glucopiranozid pentru β-N-acetilglucozaminidază.
Modul de lucru : La 0,35 ml tampon citrat 0,05 M pH = 4,6 se adaugă 0,01 ml substrat. După o incubare de 10 minute la 37°C se adaugă 0,5 ml enzimă, incubîndu-se apoi 30 minute la 37°C. După incubare se adaugă 0,65 ml carbonat de sodiu 0,2M pentru stoparea reacţiei şi dezvoltarea culorii *p*-nitro-fenolului eliberat. În paralel cu proba se face şi un martor la care adăugarea enzimei urmează după incubarea timp de 30 minute a substratului cu tampon şi adăugarea carbonatului de sodiu 0,2M. Diferenţa extincţiei probei şi martorului (ΔE) se citeşte la 405 nm după 15 minute de la stoparea reacţiei la un aparat de tip FEK. Pentru evaluarea cantităţii de *p*-nitro-fenol eliberat se trasează o curbă etalon de *p*-nitro-fenol între concentraţiile 0,01 μmoli şi 0,1 μmoli.
Se consideră o unitate enzimatică cantitatea de enzimă care eliberează 1 μmol de *p*-nitro-fenol într-un minut la 37°C. Activitatea specifică se defineşte ca fiind unităţi enzimatice/mg proteină.
Determinarea activităţii proteolitice. Activitatea proteolitică s-a determinat pe hemoglobină denaturată acid, ca substrat, la pH = 3,5 (18). Se lucrează în paralel o probă şi un martor astfel: La 0,3 ml tampon citrat de sodiu 0,1M pH = 3,5 se adaugă 1 ml hemoglobină denaturată (1,5 g%) şi 0,2 ml enzimă. Proba se incubează 60 minute la 37°C iar martorului se adaugă 2 ml acid tricloracetic 10%. Aceeaşi cantitate de acid tricloracetic se adaugă şi probei. După filtrare se determină extincţia martorului şi probei la 280 nm. Prin diferenţa extincţiilor probei şi martorului şi raportarea la o curbă etalon de concentraţii proteice, se determină cantitatea de proteină eliberată de enzimă proteolitică.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

În urma trasării cromatogramei s-au colectat următoarele „fracţiuni totale" : F_1 dintre eprubetele 20—40, F_2 dintre eprubetele 41—69, F_3 dintre eprubetele 70—94, F_4 dintre eprubetele 95—110 şi F_5 dintre eprubetele 111—130. Fiecare „fracţiune totală" s-a concentrat cu ajutorul ultrafiltrului Amicon A-50 cu o membrană PM 30 la un volum total de 10 ml. Concentraţiile proteice finale sînt date în tabela 1.

Tabela 1

Concentraţiile finale ale „fracţiunilor totale" din cromatografia pe DEAE-Sephadex A-50 a 4 ml extract enzimatic de Phaseolus

Fracţiunea	Volum iniţial (ml)	Volum final (ml)	Conc. prot. iniţială (mg/ml)	Conc. prot. finală (mg/ml)
F_1 (20—40)	40	10	0,093	0,12
F_2 (41—69)	60	10	0,02	0,10
F_3 (70—94)	50	10	0,08	0,40
F_4 (95—110)	27,5	10	0,24	0,50
F_5 (111—130)	40	10	0,4	0,9

S-au determinat activitățile celor patru enzime exoglicozidazice pentru fiecare „fracțiune totală" din tabela 1. Unitățile enzimatice ale „fracțiunilor totale" din cromatografia pe DEAE-Sephadex A-50 din 300 g cotiledoane de *Phaseolus vulgaris* sînt date în tabela 2.

Tabela 2

Unitățile enzimatice ale „fracțiunilor totale" din tabela 1 din 300 g cotiledoane de Phaseolus vulgaris.

Fracțiunea	β-galactozidază	β-glucozidază	α-manozidază	β-N-acetilglucozaminidază
F_1	60	6	0	0
F_2	40	3	6	0
F_3	3	3	30	60
F_4	0,3	3	0,3	60
F_5	0,3	0	0	11

Activitățile specifice ale enzimelor exoglicozidazice din „fracțiunile totale" din tabela 1 sînt date în tabela 3.

Tabela 3

Activitățile specifice ale „fracțiunilor totale" din tabela 2

Fracțiunea	β-galactozidază	β-glucozidază	α-manozi-dază	β-N-acetil-glucozaminidază
	10^3	10^3	10^3	10^3
F_1	1500	150	0	0
F_2	1200	80	18	0
F_3	2,1	2	230	450
F_4	1,6	1,6	1,6	360
F_5	0,9	0	0	38

S-au determinat activitățile proteolitice acide ale „fracțiunilor totale" și nu s-a constatat nici o activitate proteolitică.

DISCUȚII

De obicei se întrebuințează pentru studierea structurii glicoproteinelor un extract total de glicozidaze din epididim (19).

Am presupus că întrebuințarea unor preparate îmbogățite cu preponderență într-o activitate enzimatică specifică, se poate să aducă rezultate mai edificatoare asupra degradării glicoproteinelor. Din preparatele purificate de noi am întrebuințat β-galactozidaza pentru degradarea peroxidazei și α-manozidaza pentru degradarea invertazei. Cu toate că β-galactozidaza este impurificată cu β-glucozidază, găsindu-se amîndouă în „fracțiunea totală" F_1, impurificarea nu afectează întrebuințarea β-galactozidazei în cercetările de degradare a unor glicoproteine ca peroxidaza (20). Nici prezența β-N-acetilglucozaminidazei în „fracțiunea totală" F_3 nu impietează întrebuințarea α-manozidazei în studiul modului de degradare a invertazei (21). Cum structura invertazei cuprinde din totalul de glucid 97% manan și 3% N-acetilglucozamină, nu este exclus ca preparatul de α-manozidază impurificat cu β-N-acetilglucozaminidază

să acţioneze şi asupra unei legături interne de N-acetilglucozaminid, eliberînd ulterior o cantitate mai mare de manan. Ceea ce este important este lipsa activităţii proteazice în fracţiunile cercetate. Prezenţa ei ar fi un impediment în studiul degradării glicoproteinelor.

CONCLUZII

Se poate spune că prepararea unor exoglicozidaze prin germinarea boabelor de fasole, precipitarea cu sulfat de amoniu şi cromatografierea pe DEAE-Sephadex A-50 este suficientă pentru întrebuinţarea acestora în studii ulterioare de degradare a glicoproteinelor.

Primit la redacţie
la 15 decembrie 1975

*Institutul
de ştiinţe biologice
Bucureşti*

BIBLIOGRAFIE

1. J. Findlay, G. A. Levvy, Biochem. J., **77**, 170 (1960).
2. J. Wooden, R. Heyworth, P. G. Walker, Biochem. J., **78**, 111 (1961).
3. B. Weissmann, S. Hadjioannou, J. Tornheim, J. Biol. Chem., **239**, 59 (1964).
4. J. C. Caygill, C. P. J. Roston, F. R. Jevons, Biochem. J., **98**, 405 (1966).
5. D. Robinson, R. G. Price, N. Dance, Biochem. J., **102**, 125 (1967).
6. H. Suzuki, Y. Ozawa, O. Tanare, Agr. Biol. hem., **30**, 1039 (1966).
7. N. Swaminatham, K. L. Maha, L. A. Donose, P. O. Bahl, J. Biol. Chem., **247**, 1775 (1972).
8. K. Matta, O. P. Bahl, J. Biol. Chem., **247**, 1780 (1972).
9. D. P. Malhatra, D. M. Dey, biochem. J., **103**, 508 (1967).
10. Y. Li, J. Biol. Chem., **241**, 1010 (1966).
11. O. P. Bahl, K. M. Agrawal, J. Biol. Chem., **243**, 98 (1968).
12. K. M. L. Agrawal, O. P. Bahl, J. Biol. Chem., **243**, 103 (1968).
13. S. M. Snaith G. A. Levvy, Biochem. J., **110**, 663 (1968).
14. E. D. Michell, J. Newmann, Phytochem., **11**, 1341 (1972).
15. H. Lis, C. Fridman, N. Shanon, E. Katcalski, Arch. Biochem. Biophys., **113**, 301 (1966).
16. A. Puzstai, Bochem. J., **101**, 379 (1966).
17. J. Findlay, G. A. Levvy, C. A. March, Biochem. J., **69**, 467 (1958).
18. R. Gianetto, C. De Duve, Biochem. J., **59**, 433 (1955).
19. R. Kleine, F. V. Shmakova V. A Lapuk, G. V. Vikha, E. D. Kaverzneva, Immunochemistry, *12*, 825 (1975).
20. C. Bandu, Z. Moldoveanu, sub tipar la Revue Roumaine de Biochimie.
21. E. Ilica, sub tipar la Revue Roumaine de Biochimie.

THE RELEVATION AND PARTIAL PURIFICATION OF CERTAIN EXOGLYCOSIDASES (β-GALACTOSIDASE, β-GLUCOSIDASE. β-N-ACETYLGLUCOSAMINIDASE AND α-MANNOSIDASE) FROM *PHASEOLUS VULGARIS*

SUMMARY

Four glycosidases were partially purified from *Phaseolus vulgaris*, var. Great Northern. Glycosidases preparation was obtained from germinated bean seeds, extracted with 0.2M citrate buffer pH 4.6, and fractionated precipitation with ammonium sulphate. DEAE-Sephadex A-50 chromatography of that preparation resulted into an enzyme distribution, quite convenient for a simple separation of β-galactosidase and α-mannosidase in a pretty pure state.

ST. CERC. BIOCHIM., 19, 1, 49–54 (1976)

EFECTUL IRADIERII MITOMICINEI-C ŞI 6-MERCAPTOPURINEI ASUPRA CREŞTERII UNEI TULPINI DE *E. COLI*

ŞTEFANIA MARCOVSKI, DOMNIŢA CRIŞAN şi SORIN COMOROŞAN

Rezumat. — Interacţiunea dintre mitomicina-C şi 6-mercaptopurina şi receptorii celulari bacterieni specifici este influenţată într-un mod discontinuu, periodic prin iradierea citostaticelor cu $\lambda = 546$ nm. Creşterea tulpinii de E. coli B prezintă un tip de răspuns diferenţiat la fiecare citostatic iradiat. Activitatea inhibitoare a celor două citostatice este semnificativ crescută numai la anumiţi timpi de iradiere eficienţi.

Interacţiunea substratelor enzimatice cu un cîmp electromagnetic, la $\lambda = 546$ nm induce o creştere discontinuă, periodică a vitezei de reacţie enzimatică. Aceste creşteri apar numai la anumiţi timpi de iradiere a substratului (1)—(5). Timpul minim de iradiere ce induce primul efect de creştere a vitezei de reacţie este notat t_m. Creşterile ulterioare ale vitezei de reacţie enzimatică apar la timpi de iradiere a substratului: $t_m+\tau$, $t_m + 2\tau$, $t_m + 3\tau$ etc., unde τ este perioada de timp fixă ce delimitează două asemenea efecte succesive. T_m şi τ, ca noi parametri enzimatici au fost relevaţi pentru un număr mare de sisteme enzimatice (6) (10) şi s-au dovedit a fi implicaţi într-un nou mecanism de control (8), (9). Rezultatele obţinute cu acest model experimental enzimă-substrat au sugerat ideea de a extinde studiul acestor parametri la unele interacţiuni biologice specifice mai complexe, de tipul drog-receptor celular. O serie de rezultate anterioare au confirmat corelarea parametrilor t_m şi τ cu mecanismele de rezistenţă bacteriană la antibiotice. Efectul indus prin iradiere a fost reprodus pe un număr de antibiotice şi s-au demonstrat modificări apreciabile ale ratelor de creştere celulară la anumiţi timpi de iradiere a antibioticelor, comparativ cu rata de creştere în prezenţa antibioticului neiradiat (5), (11), (12), (13). Continuînd această direcţie de investigare a interacţiunilor drog-receptor celular, abordăm în această lucrare studiul efectului iradierii unor substanţe citostatice asupra ratelor de creştere bacteriană, selectînd mitomicina-C (MC), dată fiind şi acţiunea sa antibiotică şi un antimetabolit de tipul 6-mercaptopurinei (6-MP).

MATERIAL ŞI METODE

Surse şi condiţii de iradiere. Sursa de lumină utilizată pentru iradierea mitomicinei şi 6-mercaptopurinei este o lampă de Hg, de înaltă presiune — General Electric tip GE H 100—A_4/T— ; expunerea substratului la timpii de iradiere selectaţi este determinată cu un dispozitiv tip Uniblitz model 100—2, controlat electronic prin Diversatron timer (Vincent Ass., Adv. Electro Mechanical Eng. Rochester, USA). Diafragma are apertura de 2,5 cm diametru şi este plasată deasupra discului de mate-

rial plastic conținînd substanța de iradiat. Precizia de măsurare a timpilor de iradiere este de ordinul 0,001 s. Sursa de iradiere este montată la 17 cm înălțime față de suprafața stratului de MC sau 6-MP. Un filtru optic LKB Hg-mono $\lambda = 546$ nm (transmitanță 30%) este interpus pentru selectarea lungimii de undă de 546 nm. Nivelul iluminării la suprafața țintă-strat de pulbere de 6-MP sau peliculă de MC — a fost în toate experimentele de 500 fc (aproximativ 5350 Lx), măsurată cu un luxmetru electronic Gossen Panlux.

MICROORGANISME ȘI CONDIȚII DE CULTURĂ

Microorganism : s-a folosit o tulpină de E. coli B furnizată de Institutul Dr. I. Cantacuzino. Mediul de cultură : peptonă 1% (Bactopeptonă Difco) — NaCl 0,5%. Inoculul este preparat în acest mediu de cultură, incubat 24 ore la 37°C. Această cultură de E. coli B în fază staționară de creștere va fi utilizată pentru inocularea mediului de cultură ce conține MC sau 6-MP. Sensibilitatea creșterii celulare la mitomicină-C și 6-mercaptopurină a fost determinată prin metoda diluțiilor ; s-au testat concentrații de mitomicină-C între 0,05 și 40 μg/ml (substanță activă). Mitomicina folosită este mitomicină-C cristalizată Kyowa (Kyowa Hakko Kogyo Co, Tokyo, Japonia) cu următoarea compoziție : 2 mg substanță activă antibiotic cristalizat și 48 mg NaCl/fiolă. S-au testat concentrații de 6-mercaptopurină (Merck) între 10^{-4}—10^{-2}M în mediul de cultură. Concentrația utilizată în experimentele de iradiere a fost selectată pe panta curbei care reprezintă dependența creșterii celulare de doza de mitomicină-C, respectiv de mercaptopurină în mediul de cultură. Această concentrație a fost în toate experimentele 0,1 μg mitomicină-C (substanța activă)/ml și de 0,5 mM6-mercaptopurină în mediul de cultură.

CONDIȚII DE LUCRU

Probe de mitomicină-C de 2,5 mg au fost dizolvate în 5 ml apă bidistilată. Din această soluție sînt apoi distribuite probe de 0,25 ml pe discuri de plastic și evaporate la temperatura camerei obținînd o peliculă uniformă. Peliculele uniforme de mitomicină au fost iradiate în condițiile standard menționate anterior. Pelicule de mitomicină-C obținute în același mod, dar neiradiate, reprezintă martorii. MC iradiată și cea neiradiată sînt imediat dizolvate în apă bidistilată pentru a da concentrația de 12,5 μg/ml. 1 ml din această soluție a fost adăugat la mediul de cultură pentru a da concentrația finală de 2,5 μg/ml echivalentă cu concentrația de substanță activă de 0,1 μg/ml. În cazul 6-MP, probele au fost iradiate în stare cristalină, uniform răspîndite pe un disc de material plastic. După iradiere, 6-MP a fost dizolvată și adăugată imediat la mediul de cultură pentru a da concentrația finală de 0,5 mM. Aceleași cantități de 6-MP neiradiată reprezintă martorii. Mediul de cultură conținînd 0,1 μg MC/ml sau respectiv 0,5 mM 6-MP este inoculat. Se urmărește creșterea E. coli B, măsurînd DO_{540nm} a probelor, timp de 24 ore folosind un spectrocolorimetru Bausch & Lomb Spectro-

nic 20. Toate culturile au fost efectuate direct în tuburile colorimetrului Bausch & Lomb (11 × 100 mm), volumul mediului de cultură/tub fiind de 5 ml. Culturile au fost incubate la 37°C. Creşterea DO_{540nm} la 24 ore de cultură a fost utilizată ca o măsură a creşterii bacteriene.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Creşterea unei tulpini de E. coli B în prezenţa mitomicinei-C prezintă modificări semnificative ale ratei de creştere bacteriană, numai pentru MC iradiată cu anumiţi timpi corespunzători valorilor $t_m = 5$ s, $\tau = 25$ s şi $t_m = 10$ s, $\tau = 20$ s (tabelul 1). Se obţin astfel două serii de „semnale", respectiv inhibiţii ale creşterii bacteriene mai marcate în prezenţa MC iradiate cu timpi din aceste serii, decît în prezenţa MC neiradiate — martor. Orice alţi timpi de iradiere intermediari, testaţi, au corespuns unor creşteri bacteriene situate în domeniul de variaţie al culturilor martor—MC neiradiată (tabelul 1). Creşterea aceleiaşi tulpini

Tabelul 1

Creşterea tulpinii de E. coli B în prezenţa mitomicinei-C (MC) iradiate

Timp de iradiere a MC (s)*)	Creşterea DO_{540nm} la 24 ore de cultură — medie ± D.S. —
0 (culturi martor)	0,216±0,003
5	*0,170*±0,008
10	*0,161*±0,006
15	0,206±0,003
20	0,213±0,005
25	0,211±0,003
30	*0,168*±0,003
35	0,216±0,003
40	0,218±0,005
45	0,213±0,005
50	*0,163*±0,005
55	*0,174*±0,004
60	0,217±0,005

*) 50 de culturi martor cu mitomicină-C neiradiată au fost efectuate, iar pentru fiecare timp de iradiere testat au fost efectuate 5 probe iradiate separat şi lucrate apoi în duplicat.

bacteriene în prezenţa 6-mercaptopurinei a relevat o singură serie de efecte ale 6-MP iradiate. Inhibiţii de creştere mai marcate decît la martori (6-MP neiradiată) apar în prezenţa 6-MP iradiate cu timpi corespunzători seriei : $t_m = 15$ s, $\tau = 20$ s (tabelul 2). Orice alţi timpi de iradiere intermediari ai 6-MP, au corespuns unor creşteri bacteriene situate în domeniul de variaţie al culturilor martor (tabelul 2).

Deci, pentru ambele citostatice, efectul inhibitor asupra creşterii bacteriene, este crescut în mod discontinuu, periodic, prin iradiere. Aceste creşteri ale activităţii inhibitorii antibiotice şi citostatice ale MC şi 6-MP pot fi corelate cu mecanismele lor de acţiune. Interacţiunea dintre fiecare drog şi receptorul celular specific este influenţată în mod discontinuu prin iradierea citostaticului cu timpii „eficienţi" din seria t_m, $t_m + \tau$, $t_m + 2\tau$.

Tabelul 2

Creșterea tulpinii de E. coli B în prezența 6-mercaptopurinei (6-MP) iradiate.

Timp de iradiere a 6-MP (s)*)	Creșterea DO_{540nm} la 24 ore de cultură — medie ± D.S. —
0 (culturi martor)	0,263±0,007
5	0,264±0,003
10	0,259±0,006
15	*0,211*±0,005
20	0,260±0,002
25	0,263±0,005
30	0,260±0,007
35	*0,226*±0,006
40	0,262±0,004
45	0,257±0,003
50	0,260±0,006
55	*0,231*±0,008
60	0,259±0,002
65	0,259±0,005

*) 30 de culturi martor cu 6-MP neiradiată au fost efectuate, iar pentru fiecare tip de iradiere testat au fost efectuate 5 probe iradiate separat și apoi lucrate în duplicat.

Întrucît rezultatele anterioare asupra sistemelor enzimatice și interacțiunilor antibiotic-receptor celular au demonstrat că fiecare pereche de parametri t_m, τ, este specifică unei enzime sau unui tip de receptor, se poate conclude că în cazul MC, cele două serii de semnale ($t_m = 5$ s, $\tau = 25$ s și $t_m = 10$ s, $\tau = 20$ s) pot fi corelate cu două tipuri de mecanisme de acțiune ale MC și deci probabil cu două tipuri de receptori celulari.

Astfel, prima serie de efecte ce apare la $t_m = 5$ s, $\tau = 25$ s poate fi caracteristică pentru toți agenții antitumorali ce interacționează cu ADN-ul. Această interpretare este sugerată de modul de acțiune al MC și de faptul că pe alți agenți cunoscuți ca interacționînd cu ADN-ul, de tip acridin orange, s-au obținut efecte similare de creștere a acțiunii inhibitorii la timpi de iradiere identici, $t_m = 5$ s, $\tau = 25$ s (14). Mecanismul de acțiune al MC este de fapt reprezentat de o multitudine de efecte biologice, observate încă de la izolarea acestui antibiotic (15). MC determină astfel, formarea ADN cross-linked in vitro și la bacterii (16), alkilează ADN-ul, s-ARN-ul, ARN-ul ribozomal, interacționează cu ribozomii și în grad mai redus cu proteinele și polizaharidele in vitro (17)—(21). Efectul MC asupra metabolismului ADN-ului și ARN-ului din E. coli (22)—(26) a demonstrat ca mecanism degradarea ambilor acizi nucleici. Această aparentă lipsă de specificitate a MC față de un anumit component celular, ar echivala în contextul nostru cu o lipsă a efectului iradierii MC, întrucît parametrii t_m și τ sînt caracteristici unor interacțiuni biologice înalt specifice. Ori apariția semnalelor corespunzînd celor două perechi de parametri t_m și τ, implică existența a două tipuri de receptori celulari, a căror interacțiune cu MC este influențată discontinuu prin iradierea acesteia. Interacțiunea MC—ADN este probabil stimulată în cazul MC iradiate cu timpii $t_m = 5$ s, $\tau = 25$ s. Seria de semnale corespunzătoare $t_m = 10$ s, $\tau = 20$ s poate fi caracteristică pentru interacțiunea dintre mitomicină și ARN și/sau ribozomi,

corespunzînd activităţii antibiotice a MC. Este cunoscut faptul că în afara acţiunii directe asupra s-ARN şi ARN-ribozomal, MC interacţionează cu ribozomii atît in vitro cît şi in vivo, determinînd degradarea acestora şi scăderea marcată a fracţiunii 50 S. Dată fiind evidenţierea anterioară a efectului iradierii pentru un număr de antibiotice şi mai ales un $t_m = 10$ s, $\tau = 20$ s pentru antibiotice cu acţiune asupra subunităţii ribozomale 50 S, tip cloramfenicol (27), se poate interpreta că această a doua serie de semnale corespunde interacţiunii MC-receptor ribozomal influenţată discontinuu, periodic prin iradierea antibioticului. Aceste două tipuri de răspunsuri ale creşterii celulare corespunzătoare celor două serii de semnale pot fi deci corelate cu două tipuri esenţiale de interacţiune a MC cu două categorii de receptori celulari : ADN şi ribozomali. Aceste tipuri de interacţiuni pot fi de asemenea corelate cu faptul că acest antibiotic conţine două grupări foarte active, chimic diferite.

În cazul 6-mercaptopurinei, efectul inhibitor asupra creşterii bacteriene este stimulat prin iradierea 6-MP cu timpii eficienţi din seria $t_m =$ 15 s, $\tau = 20$ s. Se poate presupune că interacţiunea citostaticului cu receptorul celular specific este influenţată în mod periodic, aceasta fiind maximă în cazul antimetabolitului iradiat 15 s, 35 s şi 55 s. Aceste efecte ce corespund unei perechi de parametri specifici t_m şi τ pot fi corelate cu mecanismul unic specific de acţiune al acestui antimetabolit, de inhibiţie competitivă la nivelul căii de biosinteză a purinelor, în special a conversiunii guaninei şi hipoxantinei în nucleotidele corespunzătoare (28), (29).

În concluzie, determinarea parametrilor t_m şi τ poate fi utilizată în investigarea unor interacţiuni biologice specifice de tipul drog-receptor celular. Stimularea acestor interacţiuni prin efectul de iradiere a substanţelor citostatice poate avea implicaţii practice deosebite în investigarea modului lor de acţiune şi în mărirea activităţii lor de inhibiţie a creşterii celulare.

Prezentat la redacţie
la 17 mai 1975

Laboratorul central de biochimie
Spitalul Clinic Fundeni
Bucureşti

EFFECT OF MITOMYCIN-C AND 6-MERCAPTOPURINE IRRADIATION UPON THE GROWTH OF *E. COLI* B STRAIN

SUMMARY

The interaction between mitomycin-C and 6-mercaptopurine and the specific bacterial cell receptors is influenced in a noncontinuous, periodical manner through the cytostatic irradiation with $\lambda = 546$ nm. The growth of *E. coli* B strain presents a differentiated response pattern to each irradiated cytostatic. The inhibitory activity of the two cytostatics is significantly increased only for certain "efficient", irradiation times.

BIBLIOGRAFIE

1. S. Comoroşan, Nature, **227**, 64 (1970).
2. S. Comoroşan, M. Cru, S. Vieru, Enzymologia, **42**, 31 (1972).
3. S. Comoroşan, S. Vieru, P. Murgoci, Biochim. Biophys. Acta. **268**, 620 (1972).
4. S. Comoroşan, P. Murgoci, Bull. Math. Biophys. **33**, 373 (1971).
5. R. Sherman, W. Yee, S. Comoroşan, D. Crişan, S. Marcovski, Chemotherapy, **20**, 227 (1974).
6. S. Comoroşan, P. Murgoci, D. Sandru, M. Cru, Physiol. Chem. & Physics, **3**, 343 (1971).
7. S. Comoroşan, M. Cru, P. Murgoci, S. Vieru, Physiol. Chem. & Physics, **4**, 1 (1972).
8. S. Comoroşan, S. Vieru, D. Crişan, D. Sandru, P. Murgoci, Physiol. Chem. & Physics, **3**, 1 (1971).
9. S. Comoroşan, S. Vieru, D. Crişan, D. Sandru, P. Murgoci, E. Alexandrescu, Physiol. Chem. & Physics, **3**, 103 (1971).
10. S. Comoroşan, D. Crişan, E. Alexandrescu, P. Murgoci, Physiol. Chem. & Physics, **4**, 559 (1972).
11. G. E. Bass, D. Crişan, Physiol. Chem. & Physics, **5**, 331 (1973).
12. S. Comoroşan, R. L. Sherman, Int. Symp. Atomic Molec. and Solid-State Theory and Quantum Biology, Sanibel Island, 1973.
13. D. Crişan, S. Marcovski, S. Comoroşan, St. Cerc. Biochim. **17**, 253 (1974).
14. S. Comoroşan, B. Vlădescu, D. Sandru, Science 1975, sub tipar.
15. W. Szybalski, V. N. Iyer, Fed. Proc. **23**, 946 (1964).
16. Y. N. Iyer. W. Szybalski, Science, **145**, 55 (1964).
17. M. N. Lipsett, A. Weissbach, Biochemistry, **4**, 206 (1965).
18. W. E. Pricer, A. Weissbach, Biochemistry, **4**, 200 (1965).
19. W. Szybalski, Microbiol. Gen. Bull., **21**, 16 (1964).
20. A. Weissbach, A. Lisio, Biochemistry, **4**, 196 (1965).
21. H. L. White, Y. R. White, Mitchell Sci. Soc., **8**, 137 (1965).
22. H. Kersten, Biochim. Biophys. Acta (Amst). **55**, 558 (1962).
23. H. Kersten, W. Kersten, Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem., **334**, 141 (1963).
24. H. Kersten, G. Leopold, B. Schnieders, Biochim. Biophys. Acta (Amst), **80**, 521 (1964).
25. H. Kersten, B. Schnieders, G. Leopold and W. Kersten, Biochim. Biophys. Acta (Amst), **108**, 619 (1965).
26. G. Leopold, B. Schnieders, H. Kersten, W. Kersten, Biochem. Z. **343**, 423 (1965).
27. S. Marcovski, D. Crişan, S. Comoroşan, Farmacia, sub tipar.
28. W. Brockman, Cancer Res., **23**, 1191 (1963).
29. M. R. Atkinson, A. W. Murray, Biochem. J., **94**, 64 (1965).

ST. CERC. BIOCHIM., 19, 1, 55–60 (1976)

ACTIVITATEA ATP-AZEI MITOCONDRIALE ÎN CONDIȚIILE RADIOSENSIBILIZĂRII CHIMICE

CORNELIA MIHAI

Rezumat. — S-a studiat efectul iradierii și al radiosensibilizării in vivo cu N-etilmaleimidă (NEM), iodacetamidă (IAM) și oleilamină (OA), asupra activității ATP-azei mitocondriale. Șobolanii normali s-au expus la 800 R — doză totală de iradiere; radiosensibilizarea s-a realizat prin administrarea substanțelor cu 15 min înaintea iradierii, în următoarele doze: NEM, 5 mg/kg; IAM, 15 mg/kg și OA 30 µl/kg.
Mitocondriile separate din țesuturile radiosensibilizate demonstrează o alterare a activității ATP-azice în comparație cu martorul. Sensibilitatea reacției ATP-azei stimulate de 2,4-dinitrofenol (DNP) scade cu iradierea și radiosensibilizarea.

Se apreciază că agenții radiosensibilizatori afectează mecanismele de reparare celulară (1) prin intervenția la nivelul metabolismului energetic celular (2), (3).

Principala sursă de energie a celulei o constituie mitocondria, structură radiosensibilă, afectată, deși reversibil, de doze moderate de radiații (1). Lucrări anterioare au arătat că NEM, IAM și OA induc — atît in vitro cît și in vivo — modificarea mai multor funcții mitocondriale: decuplarea fosforilării oxidative, alterarea cuplării mecanochimice, a consumului de oxigen și a controlului respirator, a conținutului în citocromi (4)—(7).

Întrucît funcționarea normală a unei celule depinde atît de capacitatea ei de a furniza și de a utiliza energie, ne-a interesat comportarea ATP-azei mitocondriale în condițiile radiosensibilizării chimice.

Iradierea in vitro (8) sau in vivo (9)—(11) a mitocondriilor din diverse țesuturi induce o creștere a activității de hidroliză a ATP, asociată unui cît de fosforilare micșorat (10) sau unui transport afectat al ionilor în mitocondrie (8).

ATP-aza este dependentă de concentrația de ATP și Mg^{2+} și are un rol important în controlul și reglarea fosforilării oxidative (12).

Scopul acestei lucrări a fost de a căuta relații cantitative între activitatea ATP-azică mitocondrială și radiosensibilizarea chimică.

MATERIAL ȘI METODĂ

Iradierea. S-au folosit șobolani Wistar adulți (100—110 g). Animalele s-au expus la iradierea totală cu 800 R, la 180 kV, 15 mA, filtru 0,50 mm Cu și s-au sacrificat după 5 zile.

Radiosensibilizarea. Șobolanii au fost injectați intraperitoneal cu 0,2 ml NEM, Koch-Light, 5 mg/kilo corp), IAM (Merck, 15 mg/kilo corp) și OA (30 µl/kilo corp), cu 15 minute înainte de iradiere. Preparatul comercial de oleilamină (Koch-Light) a fost redistilat sub vid și azot.

Mitocondriile de ficat s-au preparat prin metoda Hogebbom (12). Pentru omogenizarea ţesuturilor s-a utilizat o soluţie de zaharoză 0,25 M conţinînd EDTA 4 mM şi adusă la pH 7,4 cu Tris. După sedimentare, mitocondriile s-au spălat şi suspendat în zaharoză 0,25 M, pH 7,4. S-a utilizat o suspensie mitocondrială avînd 20 mg proteină/ml. Conţinutul proteic al preparatelor mitocondriale s-a analizat prin metoda Folin (13); ca standard s-a folosit albumina de ou (5 × crist., Sigma).

Activitatea ATP-azică s-a determinat, cu unele modificări, după (12). Incubarea anterioară determinării a fost de 4 min la 30°C, într-un mediu conţinînd zaharoză 80 mM, Tris-HCl 25 mM (pH 7,4), KCl 7,5 mM, mitocondrii (1 mg proteină). S-au adăugat apoi $MgCl_2$ (4 mM), DNP (în concentraţiile arătate în legenda figurilor), $CaCl_2$, (0,3 mM) şi Na_2ATP (3 mM, pH 7,4,) realizîndu-se un volum final de 1,5 ml; după incubarea ulterioară de 15 min la 30°C, reacţia s-a blocat prin adăugare de acid triclor-acetic în concentraţia finală 5%. După filtrare prin hîrtie Whatman nr. 1, fosforul anorganic s-a dozat, în volume fixe din filtrate, prin metoda Fiske-Subbarow (14).

Activitatea enzimatică s-a exprimat ca nmoli de fosfat anorganic eliberat per mg proteină mitocondrială, într-un minut. Sensibilitatea reacţiei stimulate de DNP s-a calculat ca raportul dintre activitatea maximă şi concentraţia maximă de inductor.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Datele prezentate în figura 1 arată că radiosensibilizatorii testaţi determină o creştere a activităţii ATP-azei mitocondriale în absenţa (A) sau în prezenţa (B) ionilor de Mg^{2+}. Un efect mai accentuat se obţine în cazul radiosensibilizării cu NEM.

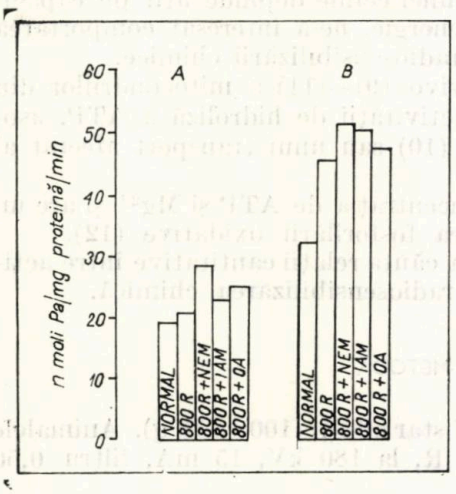


Fig. 1. — Activitatea ATP-azică mitocondrială în absenţa (*A*) şi în prezenţa ionilor de Mg^{2+} (4 mM) (*B*).

Activitatea ATP-azică scăzută constituie o reflectare a integrităţii mitocondriale; creşterea acestei activităţi este determinată de lezarea structurală, ceea ce atrage după sine o labilitate crescută a sistemelor enzimatice mitocondriale (16). Rezultatul ar putea fi corelat cu date ante-

rioare (4) asupra decuplării fosforilării oxidative în mitocondriile radiosensibilizate.

Cum decuplanții fosforilării oxidative au un efect de stimulare a activității ATP-azice mitocondriale, am încercat să urmărim răspunsul mitocondriilor la ionii de Ca^{2+} (cunoscuți că reacționează cu mitocondriile implicînd un mecanism alternativ fosforilării oxidative (17)) și la DNP (în concentrația 0,2 mM cunoscută să decupleze fosforilarea oxidativă mitocondrială (16)).

S-a observat (fig. 2) că, activarea exercitată de acești agenți este diminuată în condițiile radiosensibilizării, efectul minim obținîndu-se în cazul NEM. Răspunsul atenuat al mitocondriilor radiosensibilizate la stimulatori ai hidrolizei ATP ar putea reflecta instalarea unei inhibiții sau o alterare parțială a enzimei.

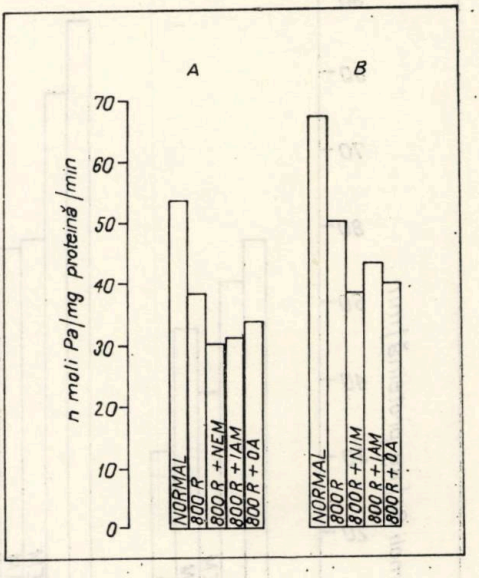


Fig. 2. — Activitatea ATP-azică mitocondrială în prezența ionilor Ca^{2+} (0,3 mM) (*A*) și a DNP (0,2 mM) (*B*).

Urmărirea activării ATP-azei mitocondriale în funcție de concentrația DNP (tabelul 1) a dus la evidențierea unui răspuns mai slab în condițiile iradierii și, mai ales, ale radiosensibilizării, reflectat prin valori tot mai crescute ale K_M și mai scăzute ale sensibilității reacției stimu-

Tabelul 1

Constantele Michaelis și sensibilitatea reacției ATP-azice mitocondriale stimulate de DNP (0,01—0,4 mM) în absența și în prezența succinatului (10 mM).

Tratament	—		Succinat	
	K_M	S	K_M	S
Normal	0,027	0,418	0,021	0,340
800 R	0,039	0,305	0,025	0,305
800 R + NEM	0,095	0,233	0,081	0,227
800 R + IAM	0,070	0,287	0,037	0,263
800 R + OA	0,062	0,251	0,045	0,269

late de DNP. Şi în acest caz inactivarea mai accentuată o prezintă mitocondriile radiosensibilizate cu NEM.

Efectul variaţiei concentraţiei DNP în prezenţa unei concentraţii fixe de succinat (10 mM) reflectă inhibiţia competitivă exercitată de substratul respirator asupra ATP-azei stimulate de DNP (17), (18). Se constată că răspunsul faţă de efectul inhibitor al succinatului scade în condiţiile radiosensibilizării, fiind reflectat de constante K_M mai mari şi de sensibilităţi de reacţie mai mici decît cele oferite în condiţii de iradiere singură.

Activitatea maximă a enzimei poate fi indusă de tratamente disruptive ca îmbătrînirea, detergenţi, îngheţare-dezgheţare, sonicare (12), (19). Figura 3 prezintă deficienţa indusă de radiosensibilizare în manifestarea

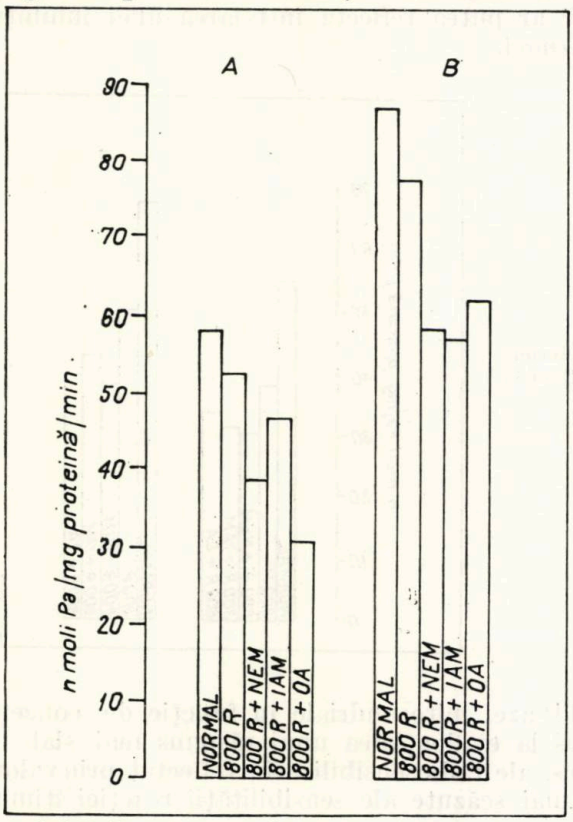


Fig. 3. — Activitatea ATP-azică mitocondrială după îmbătrînire 24 h la 4°C(*A*) şi după îngheţare — dezgheţare şi adaus de $MgCl_2$ (4 mM) şi DNP (0,2 mM) în mediul de reacţie (*B*).

activităţii maxime a enzimei, atunci cînd mitocondriile au fost îmbătrînite (*A*) sau cînd activitatea ATP-azică a fost dozată în prezenţa ionilor Mg^{2+} şi a DNP, după ce suspensiile mitocondriale au fost îngheţate şi dezgheţate de două ori.

S-ar părea că activitatea mascată a enzimei nu poate fi stimulată maxim de tratamentul disruptiv atunci cînd mitocondriile provin din ficatul şobolanilor radiosensibilizaţi.

Rezultatele sînt în concordanţă cu cele de microscopie electronică ale lui Braun (20) şi de cuplare mecanochimică ale lui Dinescu (6), (7), care arătau că iradierea şi radiosensibilizarea cu reactivi tiolici intensifică alterarea mitocondriilor.

CONCLUZII

Iradierea şi, în special, radiosensibilizarea cu reactivi chimici induc o alterare a activităţii ATP-azice mitocondriale, manifestată printr-un răspuns mai slab la stimulatori ai activităţii enzimatice. Această alterare pare să implice activarea enzimei, reflectînd o scindare crescută in situ a rezervelor de ATP, inhibiţia stimulării prin decuplanţi, alterarea controlului exercitat de substratul respirator, precum şi deficienţa unei stimulări maxime prin tratamente disruptive.

MULŢUMIRI

Autoarea doreşte să mulţumească dr. Gabriela Dinescu-Romalo pentru încurajarea şi sugestiile oferite cu generozitate atît în perioada determinărilor experimentale, cît şi a redactării.

Mulţumesc de asemenea, colegului meu fiz. T. Săndulescu pentru asistenţa oferită la iradierea animalelor.

Prezentat la redacţie la 8 mai 1975

Institutul Oncologic Bucureşti
Laboratorul de imunologia
şi biochimia bolii canceroase

MITOCHONDRIAL ATP-ASE ACTIVITY IN THE CONDITIONS OF RADIOSENSITIZATION WITH DRUGS

SUMMARY

The effect exerted by the *in vivo* irradiation and radiosensitization with N-ethylmaleimide (NEM), 2-iodoacetamide (IAM) and oleylamine (OA) upon mitochondrial ATP-ase activity was studied. The normal rats were exposed to 800 R whole-body X-irradiation. Radiosensitization was achieved by the administration of the drugs, 15 min. before irradiation in the following doses: NEM, 5 mg/kg; IAM, 15 mg/kg; OA, 30 l/kg.

The mitochondria separated from radiosensitized tissues show an alteration of ATP-ase activity as compared to the control. The sensitivity of th 2,4-dinitrophenol (DNP) stimulated ATP-ase activity decreases with irradiation and radiosensitization.

BIBLIOGRAFIE

1. E. Schwartz, *The Biological Basis of Radiation Therapy*, Ed. B. Lippincott, Philadelphia, 1966.
2. H. Fritz-Niggli, Ch. Michel, 2nd Intern. Symp. Radiosens. Radioprot. Drugs, Roma, 1969, Abs. 38, p. 37.
3. W. A. Maxwell, E. Spoerl, J. Cell Biol., **47**, 132a, (1970).
4. G. Dinescu, C. Mihai, Oncol. Radiol., XI, (1972).
5. — 5th Intern. Congress. Pharmacol., 1972, Abs. 343, p. 58.
6. — 9th Ann. Meet. Eur. Soc. Rad. Biol., Roma, 1972, p. 43.
7. — Rev. roum. Biochim., **10**, 23, (1973).

8. E. D. Wills, Int. J. Radiat. Biol., **6**, 517, (1966).
9. J. F. Thomson, Rad. Res., **21**, 46 (1964).
10. A. Goldfeder, J. N. Selig, Rad. Res., **37**, 499, (1969).
11. A. S. Aiyar, K. C. Alexander, A. Streenvasan, 9th Intern. Congr. Biochem., Stockholm, 1973, Abs. 4c5.
12. I. Mihăilescu, E. Cristea, Rev. roum. Biochim., **9**, 235, (1972).
13. G. Hogeboom, W. Schneider, G. Palade, J. Biol. Chem., **172**, 619, (1948).
14. V. Ghetie, V. Micusan, *Analiza imunochimică*, Ed. Academiei R.S.R., București, 1966, p. 142.
15. S. P. Colowick, N. O. Kaplan, Meth. Enzymol., Acad. Press, 1957, vol. 3, p. 157.
16. J.B. Chappell, R. G. Hansford, în *Subcellular Components*, Ed. G.D. Birnie, Silvia Fox, London, Butterworths, 1968, p. 43.
17. A. Fonyo, Biochim. Biophys. Acta, **81**, 196, (1964).
18. R. D. Veldsema-Curie, E. C. Slater, Biochim. Biophys. Acta, **162**, 310, (1968).
19. P. L. Pedersen, T. Eska, H. P. Morris, W. A. Catterall, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 1079, (1971).
20. H. Braun, 2th Intern. Symp. Radiosens. Radioprot. Drugs, Roma, 1969, p. 389.

ST. CERC. BIOCHIM., 19, 1, 61–68 (1976)

PURIFICAREA PIRUVATKINAZEI DIN MUȘCHI DE ȘOBOLAN ȘI CINETICA DE REACȚIE ÎN PREZENȚA ATP ȘI CP

NATALIA MOLDOVEANU

Rezumat. — S-a purificat piruvatkinaza (PK) din mușchi de șobolan și s-a obținut un preparat enzimatic cristalin cu K_m pentru fosfoenolpiruvat (PEP) = 0,74 $\times 10^{-4}$ M și K_m (ADP) = 0,26 $\times 10^{-3}$ M. Prin cercetarea efectului ATP asupra preparatului enzimatic s-a constatat că la concentrații mici de PEP și ADP, ATP determină o inhibare a activității PK, inhibiția fiind de tip competitiv față de PEP și ADP. La concentrații mici de substrat (PEP), CP are de asemeni un efect inhibitor asupra activității PK, inhibiția fiind de tip competitiv față de PEP. În aceleași condiții experimentale gradul inhibiției determinat de ATP asupra PK este mai mare decît acela determinat de CP. Din variațiile activității enzimatice în funcție de concentrațiile de PEP, ADP, ATP și CP, se fac deducții asupra dependenței activității PK de starea funcțională a mușchiului.

Piruvatkinaza este o enzimă care, în ultimul timp, a început să fie amplu analizată din punct de vedere cinetic, al structurii sale și a rolului său de reglare a metabolismului glucidic (1), (2). Aceste studii au fost determinate, pe de o parte, de poziția pe care această enzimă o ocupă la joncțiunea dintre glicoliză, gliconeogeneză și respirație, și, pe de altă parte, de rolul său de coordonare, pus în evidență mai ales în ficat și în țesuturi tumorale (3), (4).

Cercetările din ultimii ani au pus în evidență existența a trei tipuri de PK :PK tip L izolată din ficat (localizată în ficat, rinichi, intestine) (3),(5),(9),PK tip M_1 izolată din mușchi (localizată în mușchi, rinichi, creier, intestine) (6), (7), (10) și PK tip M_2, izolată din țesuturi embrionare, țesuturi tumorale și culturi de celule (localizată în rinichi, splină, plămîni, testicule, ovare, stomac, țesut adipos, ficat, intestine, inimă, creier, tumori și țesuturi embrionare) (1), (4). Pînă nu demult s-a considerat că numai PK tip L și M_2 au proprietăți de reglare, dar unele cercetări recente au pus în evidență inhibiția de tip allosteric determinată de fenilalanină asupra PK din mușchi (7), (8).

În continuarea cercetărilor noastre anterioare (11)—(14) în care am obținut enzime de înaltă puritate și am adus unele contribuții la cunoașterea modului de reglare a metabolismului glucidic de către enzimele sale, prezentăm în lucrarea de față rezultatele obținute la purificarea PK din mușchi de șobolan precum și cele privitoare la efectul produs de fosfoenolpiruvat, ADP, ATP și CP asupra enzimei obținute.

MATERIAL ȘI METODE

PK a fost purificată din mușchi de șobolan după metoda dată de Tietz și Ochoa (15) și procedeul folosit de Tanaka și col. (6). Toate operațiile au fost efectuate între 0—4°C. După sacrificarea animalelor s-au

scos mușchii striați, s-au tocat, s-a făcut o extracție totală a proteinelor cu o soluție de KCl 0,15 M, $MgSO_4$ 0,005 M și EDTA 0,001 M, apoi s-a procedat la precipitarea fracționată cu sulfat de amoniu, îndepărtîndu-se fracțiunile pînă la 54% saturare și prelucrîndu-se fracțiunea peste 54% saturare prin precipitări fracționate, dialize și cromatografie pe fosfat de celuloză, după cum rezultă din tabela 1.

Tabela 1

Purificarea piruvatkinazei din mușchi de șobolan

Etape de purificare	Activitatea specifică(μmoli piruvat/ min/mg proteină)
EXTRACT TOTAL	3,75
pp. $(NH_4)_2SO_4$ între 0—54%	
pp	
sup	
pp. $(NH_4)_2SO_4$ între 54—67%	18,20
Dializă	
pp. $(NH_4)_2SO_4$ 55%	70,00
Dializă	
Cromatografie pe fosfat de celuloză	120,00
Cristalizare	
Cristalizare	
Recristalizare	180,00

În tabela 1 sînt trecute principalele faze de purificare și activitatea specifică corespunzătoare. Prin procedeul folosit s-a obținut un preparat enzimatic cu o înaltă activitate specifică (180 μ moli piruvat/min/mg proteină).

Concentrația proteică a fost determinată după metoda Lowry (16) și spectrofotometric la 280 nm.

Controlul purității preparatului obținut s-a făcut electroforetic în gel de poliacrilamidă. După electroforeză activitatea PK a fost localizată după metoda Susor și Rutter (5), prin cuplarea reacției PK cu a lactat dehidrogenazei (LDH).

Determinarea activității PK s-a urmărit spectrofotometric, din min în min, piruvatul format în reacția PK (prin cuplarea cu LDH) este redus la lactat, în prezența NADH care oxidîndu-se la NAD determină modificarea extincției la 340 nm.

Preparatul de LDH (ca enzimă intermediară în determinarea activității PK) a fost purificat în laboratorul nostru din mușchi de iepure după o tehnică descrisă anterior (14).

Amestecul de reacție, la determinarea activității PK, a constat din : tampon TRIS-HCl 50 mM, pH 7,4, $MgSO_4$ 5 mM, KCl 100mM, NADH 0,1 mM, 50 μg LDH, 10 μg PK purificată de noi, și între 0,05—1 mM ADP. Reacția a fost declanșată cu 0,02—2 mM PEP în funcție de varianta experimentală urmărită. Temperatura la care s-a lucrat a fost de 25°C. În variantele în care s-a urmărit efectul AT și CP condițiile au fost cele menționate, adăugîndu-se mediului inițial de reacție între 1—10 mM ATP și, respectiv, CP.

REZULTATE

În figura 1 este redată curba de saturare a activității PK față de concentrațiile crescînde de PEP. Viteza de reacție este exprimată în μmoli piruvat/min/mg proteină. După cum reiese din fig. 1, activitatea PK din

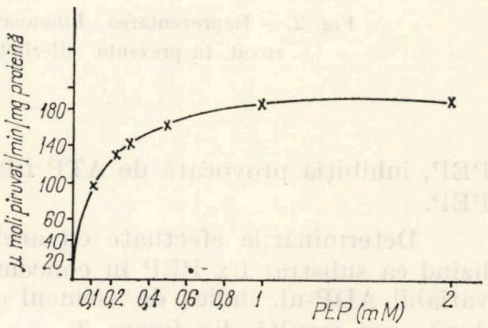


Fig. 1. — Curba de saturare a activității piruvatkinazei față de fosfoenolpiruvat.

mușchi crește cu concentrația substratului după o relație reprezentată printr-o curbă parabolică, pînă la 0,8—1 mM PEP, ca apoi curba să tindă spre un platou.

Calcularea constantei Michaelis (K_m) în cazul folosirii ca substrat a PEP, la 1 mM ADP, dă o valoare de $0{,}74 \times 10^{-4}$ M, iar în cazul folosirii ca substrat a ADP, la 1 mM PEP, $K_m = 0{,}26 \times 10^{-3}$M.

În varianta experimentală în care am urmărit activitatea PK în prezenţa diferitelor concentraţii de ATP (1—5 mM) la concentraţii variabile de PEP şi a unei concentraţii de ADP de 0,5 mM, am constatat că ATP-ul determină o inhibiţie a activităţii PK. Reprezentarea după Lineweaver-Burk (fig. 2), indică o inhibiţie de tip competitiv faţă de

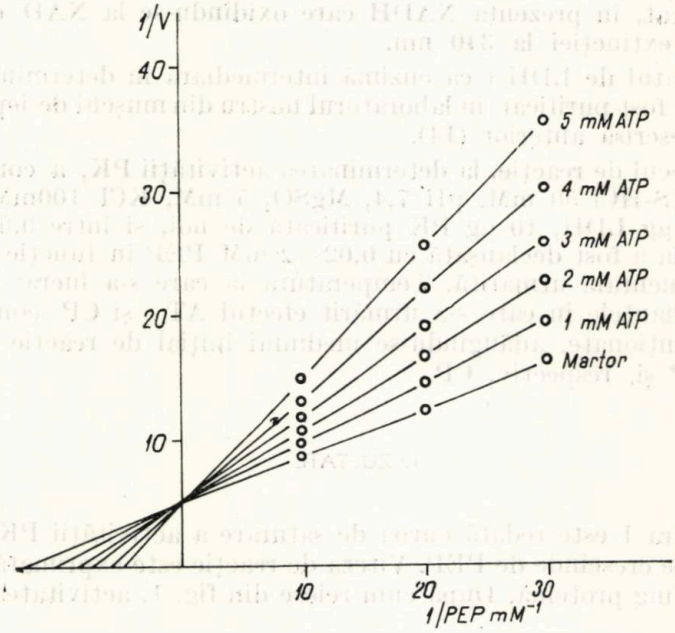


Fig. 2. — Reprezentarea Lineweaver-Burk faţă de fosfoenolpiruvat în prezenţa diferitelor concentraţii de ATP.

PEP, inhibiţia provocată de ATP fiind mai mare la concentraţii mici de PEP.

Determinările efectuate cu aceleaşi concentraţii de ATP, dar utilizînd ca substrat fix PEP în concentraţie mică (0,1 mM) şi ca substrat variabil ADP-ul, indică de asemeni o inhibiţie a PK de tip competitiv, după cum rezultă din figura 3.

Diminuarea activităţii PK în funcţie de diferitele concentraţii de ATP, la 0,1 mM PEP este ilustrată în figura 4, unde este redată procentual scăderea activităţii enzimatice, constatîndu-se că la 10 mM ATP inhibiţia este de 80%.

În varianta experimentală în care am urmărit efectul determinat de CP asupra activităţii PK din muşchi de şobolan, am constatat că la

ST. CERC. BIOCHIM., 19, 1, 81–85 (1976)

CERCETĂRI CAROTENOTAXONOMICE LA PLANTE SUPERIOARE.

VIII. PIGMENȚI CAROTENOIDICI ȘI CLOROFILIENI DIN UNELE PLANTE LEGUMINOASE

GAVRIL NEAMȚU, TIBERIU LÁSZLO, CORINA BILAUS și GHEORGHE ILLYES

Rezumat. — S-au cercetat pigmenții carotenoidici și clorofilieni din șase specii de leguminoase din subfamilia *Papilionaceae*. Între pigmenții carotenoidici există deosebiri calitative și cantitative, iar între cei clorofilieni apar numai deosebiri cantitative, ce nu au o semnificație deosebită.
Dintre pigmenții carotenoidici predomină cei cu structură β-iononică față de pigmenții cu structură α-iononică. Pigmentul principal este β-carotina, alături de care s-au identificat luteina, zeaxantina, violaxantina, neoxantina și criptoxantina. În unele specii apare în cantitate mică α-carotina și anteraxantina.

Plantele leguminoase, cu toate că sînt extrem de numeroase ca specii și prezintă o mare importanță economică (1)(2)(3) au fost foarte puțin studiate sub aspectul pigmenților carotenoidici (4)—(8). Pînă în prezent nu s-a efectuat un studiu comparativ asupra pigmenților carotenoidici din diferite plante leguminoase și nu s-au stabilit anumite corelații între pigmenții carotenoidici și principalele substanțe existente în aceste plante.

În această lucrare se prezintă pigmenții carotenoidici și clorofilieni din șase specii de leguminoase din subfamilia *Papilionaceae*, cu importanță alimentară și furajeră mai însemnată. S-a urmărit de asemenea determinarea unui criteriu carotenotaxonomic și stabilirea unei corelații între pigmenții carotenoidici și substanțele proteice.

MATERIAL ȘI METODE

Plantele leguminoase cercetate, cu indicarea denumirii lor științifice și populare, a perioadei de recoltare și a locului de întreținere a culturilor, se prezintă în tabela 1.

Pentru cercetarea pigmenților carotenoidici și clorofilieni s-a folosit material foliar proaspăt, recoltat în 1974, de pe plante crescute în cîmpul experimental. Recoltarea probelor s-a făcut după înflorirea plantelor, în faza de formare a fructelor, cînd în frunze se intensifică procesul de biosinteză a substanțelor proteice.

Extragerea pigmenților s-a făcut cu amestec de eter de petrol-acetonă-metanol, în raport de 6: 3: 1. Pentru separarea și purificarea pigmenților s-a folosit cromatografia pe coloană, utilizînd ca adsorbant amestec de oxid de magneziu cu nisip fin. Developarea coloanelor adsorbante s-a făcut cu amestec de eter de petrol, benzen pînă la 40 % și acetonă pînă la 2 %. Pentru verificarea purității pigmenților prin cromato-

Tabela 1

Nr. crt.	Denumirea științifică a speciei	Denumirea populară	Perioada de recol tare a materialului	Locul de întreținere a culturilor și de recoltare a materialului
1	Cicer arietinum L.	Năut	Lunile VI—VII	Stațiunea Didactică Experimentală a Inst. agronomic din Cluj-Napoca, la
2	Glycine hispida Maxim.	Soia	Lunile VII—VIII	Sapca Verde
3	Lens culinaris Medik.	Lintea	Lunile V—VIII	Sapca Verde
4	Lupinus albus L.	Lupin	Lunile IV—VII	—"—
5	Pisum sativum L.	Mazăre	Lunile V—VI	—"—
6	Vicia faba L.	Bob	Lunile VI—VII	—"—

grame de amestec și pentru determinarea pigmenților carotenoidici din flori, semințe uscate și tulpini s-a folosit cromatografia în strat subțire, utilizînd ca adsorbant oxid de magneziu, iar ca developant eter de petrol-acetonă-metanol, în raport de 8 : 1 : 1. Pentru separarea pigmenților clorofilieni prin cromatografia în strat subțire s-a folosit ca developant un amestec format din neofalină-cloroform-alcool etilic, în raport de 30 :2 :1.

Identificarea și determinarea pigmenților carotenoidici s-a făcut prin metode cromatografice, spectroscopice și colorimetrice, la fel ca și în lucrările anterioare (9)(10). Pigmenții clorofilieni s-au determinat după metoda prezentată de I. Maróti și Eva Gabnai (11).

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Conținutul pigmenților carotenoidici și clorofilieni din frunzele plantelor cercetate (ce reprezintă media mai multor determinări), se prezintă în tabela 2.

Din determinările efectuate reiese că frunzele acestor plante au un conținut ridicat de pigmenți carotenoidici și clorofilieni.Între pigmenții carotenoidici există deosebiri atît calitative cît și cantitative, iar între cei clorofilieni apar numai deosebiri cantitative, ce nu au o semnificație deosebită.

Dintre pigmenții carotenoidici, în cantitatea cea mai mare se află β-carotina, ceea ce mărește valoarea biologică a plantelor verzi ca surse de provitamină A, în furajarea animalelor. Raportul dintre β-carotină și luteină este mai mare de 2 la 1 la toate speciile, ceea ce poate constitui un criteriu carotenotaxonomic pentru acest grup de plante. Ca un alt aspect caracteristic menționăm prezența zeaxantinei în cantitate mai mare față de conținutul acestui pigment în frunzele altor plante superioare (12)—(14), ceea ce poate contribui de asemenea la caracterizarea carotenotaxonomică a acestor plante. În cantitate relativ însemnată se află și carotenoidele epoxidice — violaxantina și neoxantina — cu excepția anteraxantinei, care se află în cantitate mică și nu s-a identificat la toate speciile. Anteraxantina poate servi ca pigment intermediar în procesul de biosinteză sau de interconversiune a violaxantinei.

Tabela 2

Conținutul de pigmenți carotenoidici și clorofilieni al frunzelor unor plante leguminoase(mg/100 g frunze proaspete)

Specia	Pigmenți carotenoidici									Pigmenți clorofilieni		
	α-Carotina	β-Carotina	Criptoxantina	Luteina	Zeaxantina	Anteraxantina	Violaxantina	Neoxantina	Total Pigmenți Carotenoidici	Clorofila a	Clorofila b	Total Pigmenți clorofilieni
1. Cicer arietinum	0,30	5,13	0,18	2,14	1,48	—	0,38	0,26	9,87	64	25	89
2. Glycine hispida	—	6,00	0,16	1,80	1,40	0,23	0,96	0,65	11,20	72	26	98
3. Lens culinaris	0,06	5,50	0,45	1,85	1,30	urme	0,77	0,43	10,36	108	40	148
4. Lupinus albus	—	5,83	0,17	2,20	1,60	0,05	0,92	0,58	11,35	77	27	104
5. Pisum sativum	—	5,40	0,20	1,98	1,25	0,12	0,65	0,48	10,08	78	29	107
6. Vicia faba	0,24	4,60	0,38	1,52	1,00	urme	0,56	0,34	8,64	63,6	21,3	84,9

Conținutul mai ridicat al unor pigmenți carotenoidici cu structură β-iononică (β-carotina, zeaxantina, violaxantina, neoxantina) ar putea fi corelat cu conținutul ridicat în substanțe proteice al acestor plante (1). Prin reacții de epoxidare și deepoxidare pigmenții carotenoidici ajută probabil indirect biosinteza substanțelor proteice. Se știe că unele cupluri de carotenoide au un rol însemnat în reacțiile de oxido-reducere și în protejarea clorofilelor și a altor substanțe biologic active de degradări fotooxidative (15). De altfel *Glycine hispida* și *Lupinus albus*, care au un conținut mai mare de substanțe proteice (1), au și un conținut relativ mai mare de pigmenți carotenoidici (tabela 2).

În plantele cercetate predomină sub aspect structural carotenoidele cu structură β-iononică (β-carotina, criptoxantina, zeaxantina, violaxantina, neoxantina), față de cele cu structură α-iononică (α-carotina, luteina), fapt ce ușurează interconversiunea dintre carotenoidele existente. Reacțiile de interconversiune ale carotenoidelor se produc cu mai multă ușurință în cadrul aceluiași tip structural, decît între carotenoide aparținînd unor tipuri structurale diferite. În flori și semințe s-au identificat numai β-carotina și luteina, al căror conținut este foarte redus. În tulpinile verzi se găsesc aceleași carotenoide ca și în frunze, dar în cantitate mult mai mică.

Între pigmenții clorofilieni apar numai deosebiri cantitative. Raportul dintre clorofila a și clorofila b la *Glycine hispida* și la *Lupinus albus* este de 2,8 la 1, iar la celelalte specii este cuprins între 2,3 — 2,7 la 1.

CONCLUZII

Plantele leguminoase au un conținut ridicat de pigmenți carotenoidici și clorofilieni în frunze.

Dintre pigmenții carotenoidici predomină cei cu structură β-iononică, care prin reacții de epoxidare și deepoxidare stimulează probabil biosinteza substanțelor proteice. Pigmentul principal este β-carotina, care mărește valoarea biologică a plantelor verzi în furajarea animalelor.

Raportul dintre β-carotină și luteină este mai mare de 2 la 1 și poate constitui un criteriu carotenotaxonomic pentru acest grup de plante.

Raportul dintre clorofila a și clorofila b la plantele cercetate este cuprins între 2,3—2,8 la 1.

Prezentat la redacție
la 10 februarie 1975

Institutul de agronomie „Dr. Petru Groza"
Catedra de biochimie Cluj—Napoca

CAROTENOTAXONOMIC INVESTIGATIONS ON HIGHER PLANTS

VIII. CAROTENOID AND CHLOROPHYLL PIGMENTS OF SOME LEGUMINOUS PLANTS

SUMMARY

Investigations were carried out on carotenoid and chlorophyll pigments of six species of Leguminosae from the sub-family of *Papilionaceae*. Between the carotenoid pigments there were noticed both qualitative and quantitative differences, while between the chlorophyll pigments there were found only quantitative ones.

Amongst the carotenoid pigments there were prevailing those with a β-ononic structure in comparison with those of an α-ononic structure. The principal pigment occurring was the β-carotene and besides it there were identified also lutein, zeaxanthin, violaxanthin, neoxanthin and cryptoxanthin. In some species α-carotene and antheraxanthin also occurred, but only in small amounts.

LITERATURĂ

1. N. Zamfirescu, V. Velican, N. Săulescu, *Fitotehnie* vol. I, ediția a II-a, Edit. Agro-Silvică, 1965, p. 464.
2. T. Săvulescu, *Flora Republicii Populare Române*, vol. 5, Edit. Academiei, 1957, p. 19.
3. Br, Segal, *Biochimia produselor alimentare*, Edit. tehnică, vol. I, 1971, p. 62.
4. D. I. Sapojnikov, G. A. Kornișenko, Fiziol. Rast., **16**, 1038 (1969).
5. L. R. G. Valadon, R. S. Mummery, J. Exp. Bot., **20**, 732 (1969).
6. A. G. Gevorkian, N. V. Bajanova, Doklady Akad. Nauk. Arm. S.S.R., **52**, 229 (1971).
7. J. M. Zatyko, Phyton., (Buenos Aires), **28**, 11 (1971).
8. T. Ignasiac, K. Lesins, Phytochemistry, **11**, 2581 (1972).
9. G. Neamțu, C. Bodea, St. cerc. biochim., **16**, 171 (1973).
10 G. Neamțu, C. Bodea, St. cerc. biochim., **17**, 41 (1974).
11. I. Maróti, Eva Gabnai, Acta Biol. Szeged., **17**, 67 (1971).
12. T.W. Goodwin, *Stravitelnaia Biohimia Karotinoidov*, Izdatelistvo Inostranoi Literaturî, Moscova, 1954, p. 13.
13. T. W. Goodwin, *Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments*, Acad. Press, London and New York, 1965, p. 127.
14. T. Swain, *Comparative Phytochemistry*, Acad. Press, London and New York, 1966, p. 121.
15. N. I. Krinsky, cit. din *Biochemistry of Chloroplast* (T.W. Goodwin), Academic Press, London and New York, 1967, vol. II, p. 431.

ST. CERC. BIOCHIM., 19, 1, 87–94 (1976)

IZOLAREA UNUI COMPONENT CU AFINITATE PENTRU IgG DE PE MEMBRANA MACROFAGELOR ALVEOLARE DE IEPURE

DOINA ONICĂ, C. MEDEŞAN, MARIANA LAKY

Rezumat. — S-a izolat de pe suprafaţa macrofagelor alveolare de iepure un component (receptorul pentru Fc) care reacţionează specific cu imunoglobulina G de iepure sau de om, avînd o greutate moleculară în jur de 136 000. Receptorul pentru Fc şi IgG umană formează un complex stabil, dificil de disociat.

Macrofagele posedă receptori specifici pentru IgG (receptori Fc) şi C3, numărul aproximativ de receptori pentru IgG fiind de 2.10^6 per macrofag (1), (2). Ataşarea IgG de receptorii de pe macrofag se face prin intermediul regiunii C_H3 (3). Constanta de asociere dintre receptorii de pe macrofagele de iepure şi IgG de iepure variază între $7{,}59 \pm 1{,}83.10^5$ şi $9{,}02 \pm 2{,}58.10^8$ l/mol în funcţie de gradul de stimulare al macrofagelor (4). Afinitatea IgG pentru receptorii specifici de pe macrofag creşte dacă IgG este complexată cu haptene bivalente sau polivalente într-un raport corespunzător echivalenţei (2), (5) sau dacă IgG este agregată (6). Aceste date sugerează că modificările conformaţionale induse în IgG în urma interacţiei cu antigenul sau în urma agregării favorizează reacţia sa cu receptorul specific.

Lucrarea de faţă şi-a propus să izoleze de pe suprafaţa macrofagelor alveolare de iepure componentul care reacţionează cu IgG (receptorul pentru Fc) folosind o tehnică de radiomarcare a suprafeţei celulare şi de precipitare specifică a acestui component din lizatul celular radioactiv, procedeu similar cu cel folosit de Baur et al (7) pentru izolarea imunoglobulinelor de pe suprafaţa limfocitelor din splina de şoarece.

MATERIAL ŞI METODE

Izolarea şi purificarea IgG de iepure s-a făcut prin precipitarea serului de iepure cu sulfat de amoniu 33 % şi cromatografiere pe DEAE-celuloză în tampon fosfat 0,02 M, pH 8(8).

Preparatul de IgG a fost gel-filtrat pe Sephadex G-200 pentru îndepărtarea agregatelor şi obţinerea de IgG monomeră.

IgG umană a fost obţinută de la Kabi, Stockholm. Preparatul a conţinut aproximativ 30 % material agregat.

Radiomarcarea IgG cu ^{131}I *şi* ^{125}I s-a făcut fie cu cloramină T după tehnica lui Greenwood şi Hunter (9) sau cu lactoperoxidază după tehnica lui Marchalonis (10). IgG radioactivă a fost separată de iodul liber prin gel-filtrare pe Sephadex G-25 în ser fiziologic.

Obţinerea macrofagelor alveolare de iepure. Macrofagele alveolare au fost izolate de la iepuri normali sau stimulaţi prin inoculare intravenoasă de

bacil Calmette-Guérin (cîte 2 injecţii a 1 ml BCG, conţinînd 20 mg proteină per ml, administrate în două zile succesive) recoltarea făcîndu-se după 2—3 săptămîni de la inoculare prin lavaj pulmonar (11).

Rozetarea macrofagelor cu eritrocite de oaie sensibilizate. Peste 0,5 ml suspensie de macrofage care au conţinut 1.10^6 celule s-au adăugat 0,1 ml suspensie 3% de eritrocite sensibilizate cu anticorpi anti-eritrocit (EA). S-a centrifugat 10 minute, la 1 000 rpm (K—23), s-a incubat 1 h la 0°C, după care s-a suspendat uşor cu o pipetă Pasteur. Celulele au fost fixate cu formol 2%, 5 minute şi colorate cu albastru de toluidină 0,2 %. S-a determinat procentul de macrofage rozetate, prin raportarea numărului de celule rozetate la numărul total de celule.

Marcarea macrofagelor cu ^{125}I s-a făcut după tehnica descrisă de Baur et al (7) pentru marcarea suprafeţei limfocitelor obţinute din splina de şoarece.

Incubarea macrofagelor cu IgG de iepure (4). 3.10^7 macrofage au fost incubate 30 minute la 37°C în 1 ml soluţie Hanks care conţine 10 mg/ml albumină serică de iepure, 1 mg/ml azidă de sodiu şi 420—450 μg IgG de iepure monomer marcată cu ^{131}I. Albumina serică de iepure şi azida de sodiu au fost adăugate pentru a limita pinocitoza IgG de iepure de către macrofage. Volumele de lucru au variat de la 5 la 20 ml. După incubare celulele au fost spălate de 5 ori cu soluţie Hanks rece care conţine azidă de sodiu 1 mg/ml (0°C, 1.250 rpm (K -23), 10 minute).

Incubarea macrofagelor cu IgG umană. Macrofagele marcate cu ^{125}I au fost incubate cu un amestec de IgG umană nemarcată şi marcată cu ^{131}I. Condiţiile de incubare au fost: 6,4—7,2 mg IgG umană/10^7 celule/ml, 1 h la 0°C, în prezenţă de 1 mg/ml azidă de sodiu. După incubare celulele au fost spălate de 4 ori cu tampon fosfat salin rece care conţine 1 mg/ml azidă (0°C, 1.250 rpm, 10 minute).

Izolarea componentului de pe membrana macrofagelor care a reacţionat cu IgG. Macrofagele care au fixat IgG de iepure—^{121}I au fost lizate prin potterizare timp de 20 minute în zaharoză 0,25 M (1—2.10^8 macrofage/ml) după care omogenatul a fost centrifugat la 900 rpm (K-23) timp de 10 minute. Supernatantului i s-a adăugat o soluţie concentrată de dezoxicolat de sodiu, în aşa fel încît concentraţia sa finală să fie de 0,75%, s-a agitat 10 minute la temperatura camerei, după care s-a centrifugat 20 minute la 6 000 rpm (K-23). Randamentul solubilizării cu dezoxicolat de sodiu 0,75% a fost de 91—93%. Supernatantul radioactiv a fost cromatografiat pe o coloană de Sephadex G-200 echilibrată cu dezoxicolat de sodiu 0,2%.

În altă variantă macrofagele—^{125}I care au fixat IgG umană—^{131}I au fost lizate prin incubare timp de 20 minute la temperatura camerei cu Nonidet P-40 (NP-40) 0,5% (1.10^7 celule/ml), după care lizatul a fost centrifugat 30 minute la 6 000 rpm (K-23). Supernatantul a fost incubat peste noapte la 4° C cu un precipitat format din IgG umană şi proteina A din Staphylococcus aureus (SpA). Proteina A ne-a fost pusă la dispoziţie cu generozitate de către prof. J. Sjöquist de la Uppsala. Un lizat celular provenit din 7.10^7 celule a fost incubat cu 10 mg precipitat. Precipitatul a fost obţinut prin amestecarea celor doi reactivi la echivalenţă, incubare peste noapte la 4°C şi spălare cu tampon fosfat salin (12). După spălare cu TFS (4 ori) a precipitatului alcătuit din IgG umană

și SpA avînd fixat pe el IgG umană-^{131}I și receptorul pentru Fc de pe macrofag-^{125}I, acesta a fost incubat la 37°C, 20 h în tampon TRIS-HCl, 0,1 M, pH8, care conține NaCl 0,2 M și SDS 1%.

Electroforeza orizontală pe gel de poliacrilamidă (*15*). S-a folosit un gel de poliacrilamidă 6% în tampon TRIS-HCl 0,075 M, pH 8,7 cu SDS 0,1% sau cu SDS 1% și uree 6 M. Cuvele electrozilor au conținut tampon borat 0,3 M, pH 8, cu SDS 0,1%. Electroforeza a durat 1,5—2 ore, curentul aplicat fiind de 1,5m A/cm. După electroforeză gelul a fost tăiat în fîșii de 1 mm, cărora li s-a determinat radioactivitatea. Drept markeri de greutate moleculară au fost folosite : IgG umană, albumină serică umană, ovalbumină, dezoxiribonucleaza incubate înainte de electroforeză cu SDS 1% în aceleași condiții ca și precipitatul.

Hidroliza cu papaină a precipitatului alcătuit din IgG umană și SpA. Precipitatul IgG umană-SpA avînd fixat pe el IgG umană-^{131}I — receptorul pentru Fc de pe macrofag-^{125}I a fost hidrolizat cu papaină 1% în prezență de cisteină 0,01M și EDTA 0,002 M la 37°C, 4 ore. Hidrolizatul centrifugat 10 minute, la 6000 rpm (K-23) a fost gel-filtrat pe o coloană de Sephadex G-150 echilibrată cu tampon TRIS-HCl 0,1 M, pH 8, care conține NaCl 0,2 M.

REZULTATE

Rozetarea EA a macrofagelor. Prezența receptorilor pentru Fc pe suprafața macrofagelor a fost pusă în evidență prin rozetarea macrofagelor cu eritrocite de oaie învelite cu anticorpi de iepure anti-hematie de oaie (rozete EA). Procentul de macrofage stimulate care rozetează cu EA este de 85—90%.

Solubilizarea IgG de iepure fixată de membrana macrofagelor alveolare. Pe membrana macrofagelor alveolare obținute de la iepuri stimulați cu BCG s-au fixat în mediu 4.10^5 molecule de IgG de iepure monomer per celulă. Acest număr este mai mic decît cel găsit de alți autori (2), (4), ceea ce s-ar putea datora unei stimulări mai reduse a macrofagelor în urma administrării la animale a numai două injecții intravenoase de BCG. Lizatul în DOC 0,75% al macrofagelor incubate cu IgG de iepure monomer — ^{131}I a fost gel-filtrat pe Sephadex G-200 (fig. 1*a*) și s-a măsurat radioactivitatea probelor eluate. IgG de iepure solubilizată de pe membrana macrofagelor se repartizează în două piscuri, care nu sînt net separate. Piscul majoritar (II) corespunde IgG de iepure (gm. 150 000), iar piscul I a conținut un material cu o greutate moleculară $>150\,000$, arătînd că o parte din IgG de iepure a rămas fixată de un component de pe membrana macrofagelor, fixare care nu a fost afectată de prezența DOC. Crumpton et al (14) a demonstrat că interacția dintre antigen și anticorp nu este afectată de concentrații de dezoxicolat de sodiu de pînă la 1%. Rezultă că concentrația de 0,75% DOC folosită de noi a permis atît solubilizarea în bune condiții a conținutului celular (randament mediu 92%), cît și păstrarea, cel puțin parțială, a interacției dintre IgG și receptorul său specific de pe membrana celulară. Totuși, majoritatea IgG pare să nu fie complexată (vezi piscul II), ceea ce s-ar putea datora fie desfacerii sale de pe receptor sau fixării inițiale nespecifice a IgG de membrana celulară.

Piscul I a fost concentrat, dializat faţă de uree 8 M şi recromatografiat pe o coloană de Sephadex G-200 echilibrată cu uree 8 M. S-a constatat că poziţia piscului I nu se modifică în urma incubării cu uree 8 M (fig. 1*b*), ceea ce denotă că complexul care conţine IgG radioactivă nu a fost disociat în aceste condiţii.

Adsorbţia complexelor alcătuite din IgG umană-^{131}I-Ireceptor pentru Fc-^{125}I cu un precipitat de IgG umană şi SpA.

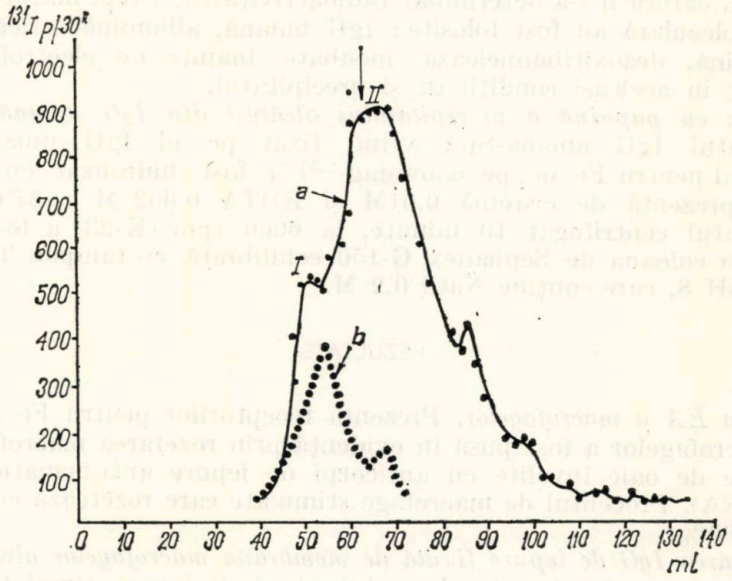


Fig. 1.a. — Gel-filtrarea pe Sephadex G-200 a conţinutului celular al macrofagelor alveolare de iepure incubate cu IgG de iepure marcată cu ^{131}I şi lizate cu dezoxicolat de sodiu 0,75%. Eluţia s-a făcut cu dezoxicolat de sodiu 0,2%; b. — Recromatografierea pe Sephadex G-200 a piscului I din Fig. 1.a., incubat cu uree 8 M. Eluţia s-a făcut cu uree 8 M. Săgeata indică poziţia IgG de iepure monomere.

Macrofagele marcate cu ^{125}I incubate cu IgG umană—^{131}I au fixat 6.10^6 — $8,6.10^6$ molecule IgG per celulă. Celulele au fost lizate cu NP-40 0,5%. În tabelul I sînt prezentate randamentul de extracţie cu NP-40 0,05% şi al proteinelor de membrană marcate cu ^{125}I şi al IgG umane marcate cu ^{131}I cît şi adsorbţia lor cu un precipitat de IgG umană

Tabelul I

Extracţia cu NP-40 0,5% a proteinelor de membrană marcate cu ^{125}I şi a IgG umane marcate cu ^{131}I şi adsorbţia lor de către un precipitat de IgG umană-SpA

Proteine de membrană marcate cu ^{125}I		IgG umană marcată cu ^{131}I
Procent de extracţie cu NP-40 0,5%	80	58
Procent de adsorbţie pe un precipitat de IgG umană-SpA	1,8	20

și SpA. Randamentul de extracție a fost de 80% pentru proteinele de membrană marcate cu ^{125}I și 58% pentru IgG umană marcată cu ^{131}I. Precipitatul IgG umană-SpA a fixat din lizatul celular 1,8% din proteinele de membrană-^{125}I și 20% din IgG umană-^{131}I, astfel încît raportul în impulsuri dintre $^{125}I/^{131}I$ a devenit în precipitat 1,35/1 în comparație cu valoarea de 14,5/1 a raportului dintre ^{125}I și ^{131}I existent în lizatul celular înainte de adsorbție. Rezultă că prin adsorbția lizatului de către precipitatul de IgG umană - SpA raportul dintre ^{125}I și ^{131}I se modifică în favoarea IgG umane - ^{131}I care reacționează specific cu SpA din precipitat.

Caracterizarea receptorului pentru Fc. Complexul alcătuit din IgG umană-receptor pentru Fc adsorbit de precipitat a fost disociat prin incubarea precipitatului în SDS 1%. Analiza electroforetică a amestecului de incubare pe gel de poliacrilamidă care conține SDS 0,1% a arătat că majoritatea radioactivității corespunzătoare atît ^{125}I cît și ^{131}I a rămas în apropierea startului, într-o poziție similară cu cea a IgG umane (fig. 2) 20% din ^{125}I a fost găsită într-o poziție corespunzătoare albuminei serice umane dimere, sugerînd că greutatea moleculară a materialului izolat

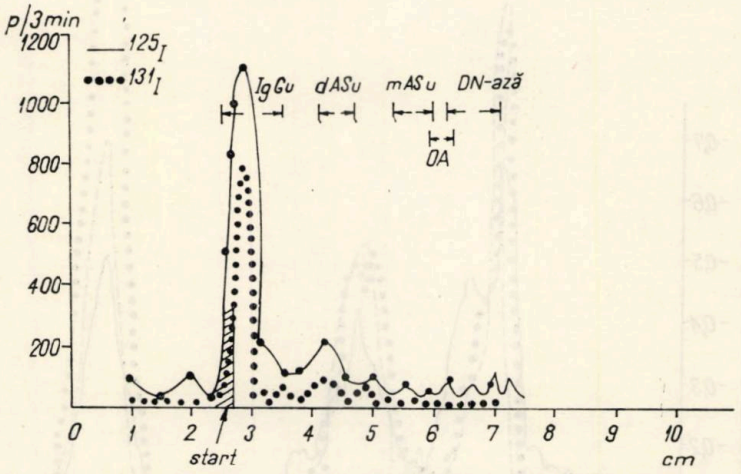


Fig. 2. — Electroforeza pe gel de poliacrilamidă a precipitatului de IgG umană și SpA care a fixat complexul IgG umană-^{131}I-receptor-^{125}I. Precipitatul a fost dizolvat în SDS 1% și analizat în gel de poliacrilamidă 6% în tampon TRIS-HCl 0,075 M, pH 8,7 cu SDS 0,1%. Liniile orizontale indică poziția proteinelor de referință: IgG umană (IgGu, greutate moleculară = 150 000), albumină serică umană dimer (d ASu, 136 000), albumină serică umană monomer (m ASu 68 000), ovalbumină (OA, 48 000), dezoxiribonuclează (DN-ază, 13 000). Proteinele de referință au fost incubate cu SDS 1% în aceleași condiții ca și precipitatul.

de pe membrana macrofagelor este în jur de 136 000. Deoarece majoritatea materialului marcat fie cu ^{131}I, fie cu ^{125}I a rămas pe start, rezultă că complexul dintre IgG umană-^{131}I și receptorul pentru Fc-^{125}I a fost incomplet disociat prin incubare cu SDS 1%. S-a încercat îmbunătățirea gradului de disociere al complexului prin incubarea sa cu uree 10 M și electroforeză în gel de poliacrilamidă care conține SDS 1% și

uree 6 M. Electroforeza în aceste condiții a indicat aceiași valoare pentru greutatea moleculară a receptorului pentru Fc, procentul de disociere al complexului rămînînd același, ca în cazul incubării numai cu SDS 1%. *Hidroliza cu papaină a complexului IgG umană-^{131}I — receptor pentru Fc—^{125}I adsorbit pe precipitatul IgG umană-SpA.* Complexul IgG umană-receptor a fost hidrolizat prin incubarea precipitatului cu papaină 1%. 80% din radioactivitate a fost eliberat în supernatant după 4 ore de hidroliză. Supernatantul a fost gelfiltrat pe coloană de Sephadex G-150. Profilul cromatografiei este prezentat în figura 3. Hidrolizatul a fost separat în 3 piscuri. Primul pisc a conținut IgG umană nemarcată pro-

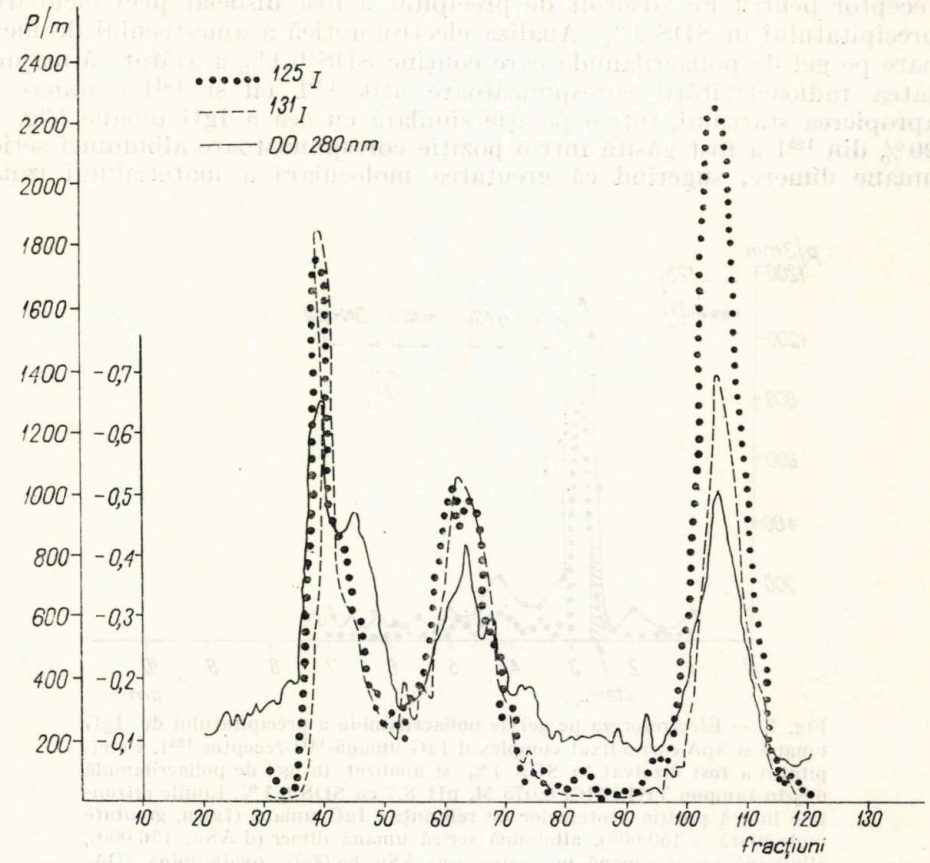


Fig. 3. — Gel-filtrarea pe Sephadex G-150 a precipitatului de IgG umană și SpA care a fixat complexul IgG umană-^{131}I-receptor-^{125}I hidrolizat cu papaină 1%. Tamponul de eluție a fost TRIS-HCl 0,1 M, pH 8.

venind din precipitatul cu SpA prezentă sub formă agregată și de monomer și complexul IgG umană-^{131}I-receptor-^{125}I a cărui poziție este identică cu cea a IgG umane agregate. Forma agregată de IgG poate fi dată de un complex solubil cu SpA sau de IgG agregată prezentă în preparatul nostru original (Kabi).

Piscul al doilea reprezintă fragmentele Fab și Fc provenite din precipitatul de IgG umană cu SpA, Fab-^{131}I, Fc-^{131}I și Fc-^{131}I legat de receptorul-^{125}I. Deoarece profilul corespunzător ^{131}I coincide cu cel al ^{125}I înseamnă că receptorul a fost hidrolizat de papaină, rezultînd un complex Fc-^{131}I-fragment de receptor-^{125}I cu o greutate moleculară asemănătoare cu cea a fragmentului Fc. Piscul al treilea a conținut peptide dializabile provenite atît din IgG umană-^{131}I, cît și din receptor-^{125}I.

Piscurile I și II au fost concentrate, acidifiate la pH 2, dializate față de tampon glicocol 0,1 M, pH 2, care conține uree 6 M și gel-filtrate pe o coloană de Sephadex G-150 echilibrată cu același tampon. În aceste condiții nu s-a observat vreo disociere a componentelor marcate cu ^{131}I de cele marcate cu ^{125}I.

DISCUȚII

În lucrarea de față s-a încercat izolarea receptorului pentru Fc de pe membrana macrofagelor alveolare de iepure cu ajutorul unui reactiv specific : imunoglobulina omologă sau eterologă. Folosind imunoglobulina omologă monomeră (de iepure) s-a arătat că aceasta reacționează cu un component de pe membrana macrofagelor, formînd un complex cu o greutate moleculară >150 000. Acest complex este foarte stabil nefiind disociat cu uree 8 M. Folosind drept reactiv imunoglobulina eterologă (umană) s-a putut izola receptorul specific pentru Fc căruia i s-a stabilit o greutate moleculară în jur de 136 000. Această valoare este mai mare decît cea raportată pentru greutatea moleculară a receptorului Fc de pe limfocite. Receptorul Fc de pe limfocitele periferice umane și din splină de șoarece a fost izolat prin co-precipitare cu un complex antigen-anticorp și i s-a determinat o greutate moleculară de 37 000 prin electroforeză în gel de poliacrilamidă cu SDS (15), (16).

Este posibil ca greutatea moleculară determinată de noi să fie mai mare din cauză că materialul supus electroforezei nu a fost redus și alchilat după cum procedează autorii citați.

Din datele noastre rezultă că receptorul Fc și IgG umană formează un complex stabil, dificil de disociat. Numai 20% din receptor a putut fi disociat prin tratament cu SDS 1%, procent care nu a fost îmbunătățit prin adăugarea de uree la pH acid. De asemenea nu s-a observat nici o disociere atunci cînd complexul IgG umană-receptor solubilizat prin hidroliză cu papaină, a fost recromatografiat la pH acid, în prezență de uree 6 M.

Notă. Autorii mulțumesc dr. doc. V. Gheție pentru sugestiile date și discuțiile purtate în timpul experiențelor și biolog Simona Botea pentru ajutorul acordat la efectuarea unor experiențe preliminare.

Prezentat la redacție
la 7 iunie 1975

Institutul V. Babeș București

ISOLATION OF A COMPONENT WITH AFFINITY FOR IgG FROM THE RABBIT ALVEOLAR MACROPHAGE MEMBRANE

SUMMARY

A component (the Fc receptor) originating from the surface of rabbit alveolar macrophages and reacting specifically with rabbit and human immunolglobulin G was isolated. Its molecular weight was established to be about 136.000. The Fc receptor and human IgG have formed a complex difficult to dissociate.

BIBLIOGRAFIE

1. A. Berken, B. J. Benaceraff, J. Exp. Med., **123**, 119, 1966.
2. J. M. Phillips-Quagliata, B. B. Levine, F. Quagliata, J. W. Uhr, J. Exp. Med., **133**, 589, 1971.
3. D. Yasmeen, J. R. Ellerson, K. J. Dorrington, R. H. Painter, J. Immunol., **110**, 1706, 1973.
4. W. P. Arend, M. Mannik, J. Immunol., **110**, 1455, 1973.
5. J. M. Phillips-Quagliata, B. B. Levine, J. W. Uhr, Nature, **222**, 1290, 1969.
6. V. Gheţie (date nepublicate).
7. S. Baur, I. Schenkein, J. W. Uhr, J. Immunol., **108**, 748, 1972.
8. J. L. Fahey, A. P. Horbett, J. Biol. Chem. **234**, 2645, 1959.
9 W. M. Hunter, F. C. Greenwood, Nature, **194**, 495, 1962.
10. J. J. Marchalonis, Biochem. J. **113**, 299, 1969.
11. D. M. Weir, *Handbook of experimental immunology*, Oxford, Edinburg, 1967, p. 1023.
12. J. Sjöquist, B. Meloun, H. Hjelm, Eur. J. Biochem., **29**, 572, 1972.
13. A. L. Shapiro, M. D. Scharff, J. V. Maizel, J. W. Uhr, Proc. Nat. Acad. Sci., **56**, 216, 1966.
14. M. J. Crumpton, Biochem. J. ,**122**, 52P, 1971.
15. * * * *Progress in Immunology*, **II**, **3**, North Holland şi American Elsevier, Amsterdam, 1974, p. 312.
16. S. Kessler, Fed. Proc., **33**, 802, 1974.

ST. CERC. BIOCHIM., 19, 1, 95–99 (1976)

EFECTUL ANESTEZIEI ASUPRA CONCENTRAȚIEI SODIULUI ȘI POTASIULUI DIN MUȘCHIUL GASTROCNEMIAN DE BROASCĂ

TR. RĂDULESCU și TR. BENȚIA

Rezumat. — S-au pus în evidență modificări precoce în conținutul ionic din mușchiul gastrocnemian de broască anesteziată cu sarea de sodiu a acidului N-metilciclohexenilmetilbarbituric (Evipan-sodiu).
Deprimarea transmisiei nervoase prin anestezie determină o scădere a concentrației sodiului, respectiv o creștere a concentrației potasiului, adică un efect contrar celui menționat în literatura de specialitate pentru denervarea de lungă durată (peste 5 zile).
Se discută semnificația acestei comportări diferite.

Se știe că suprimarea transmisiei impulsurilor nervoase, prin secționarea nervului sciatic, determină o alterare a metabolismului muscular care se reflectă la nivelul diferitelor componente ale mușchiului striat (1), (2), (3). Denervarea afectează de asemenea conținutul unor cationi anorganici cu rol deosebit de important atît în metabolismul mușchiului și în activitatea sa funcțională, cît și în funcția celulară. Astfel, Hines și col. (4) și Humoller și col. (5) au constatat o creștere a concentrației, sodiului, respectiv a scădere a concentrației potasiului, în mușchiul gastrocnemian de șobolan denervat. Aceste modificări apar abia după 3—5 zile de la secționarea nervului sciatic și au fost puse pe seama atrofiei mușchiului. O comportare asemănătoare, pe mușchi striați de diferite proveniențe, a fost semnalată ulterior de mai mulți autori printre care și de noi (6), (7), (8).

Literatura de specialitate menționează totuși apariția, în urma denervării, a unor perturbări la nivelul proteinelor musculare chiar înainte de atrofierea mușchiului (9), (10). Pe de altă parte, noi am constatat în lucrări anterioare (8), (11) unele modificări precoce în distribuția Na^+ și K^+ în mușchiul striat denervat (1—3 zile). Aceste rezultate fac plauzibilă presupunerea că întreruperea transmisiei impulsurilor nervoase joacă un rol independent de procesul de atrofie musculară.

Avînd în vedere că agenții hipnotici și anestezici deprimă transmisia sinaptică în sistemul nervos central, era de așteptat ca aceștia să determine, ca și denervarea, modificări precoce similare. În acest scop s-a cercetat acțiunea sării de sodiu a acidului N-metilciclohexenilmetilbarbituric (Natrium-Evipan Bayer), anestezic general din categoria menționată, asupra nivelului sodiului și potasiului din mușchiul gastrocnomian de broască.

MATERIALE ȘI METODE

Experiențele s-au efectuat pe mușchiul gastrocnemian de broască (Rana ridibunda). S-a lucrat pe loturi de broaște de aproximativ 60 g.

Anestezia s-a realizat prin injectarea în sacii dorsali a unei soluții de Evipan-sodiu 0,25%. Doza de 300 mg/kg corp a fost administrată în

două reprize, la interval de 60 min. Mușchii au fost excizați la două ore de la prima injecție. Ca martor s-a folosit un lot de broaște spinalizate la care excizarea mușchilor s-a făcut după trei ore de la operația de distrugere a măduvei spinării.

Efectul excitării electrice directe s-a urmărit pe un lot anesteziat 24 de ore cu o doză de 300 mg/kg corp de Evipan-sodiu în soluție 0,5%. Animalul de experiență era fixat pe un suport. Contracțiile izotonice erau obținute prin aplicarea la unul din picioarele posterioare a unor electrozi conectați la un generator de impulsuri (1500 imp, 5/s, 2 mA), în condițiile menționate într-o lucrare anterioară (12). Mușchiul gastrocnemian pereche menținut în repaus servea ca martor.

Dozarea sodiului și potasiului s-a efectuat la fotometrul cu flacără Zeiss, în extractul obținut prin tratarea mușchiului cu acid acetic diluat, cald (13). Valorile respective sînt exprimate în mM/kg țesut umed.

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Cu altă ocazie (3), (14), (15) s-a arătat că distrugerea măduvei spinării are o acțiune similară cu aceea a unui curent electric slab determinînd, ca și acesta din urmă, modificări reversibile ale unor componente din mușchi.

Întrucît în experiențele noastre am folosit ca martor un lot de broaște cu măduva spinării distrusă, era necesar să stabilim efectul spinalizării asupra conținutului în sodiu și potasiu din mușchi. În acest scop s-au dozat acești cationi în mușchii gastrocnemieni proveniți din următoarele loturi : lot normal, lot spinalizat cu excizare imediată a mușchilor și lot spinalizat cu excizarea după două ore de la această operație. Datele obținute sînt cuprinse în tabela 1.

Tabela 1

Concentrația Na și K din mușchiul gastrocnemian de broască în funcție de durata spinalizării

	Lot martor	Lot spinalizat Mușchi gastrocnemieni excizați imediat			Lot spinalizat Mușchi gastrocnemieni excizați după 2 ore		
Nr. determinări	10	6	Sd	P	6	Sd	P
mM Na per kg țesut umed	5,40	9,27	0,93	$<0,01$	5,36	0,79	Nesemnificativ
mM K per kg țesut umed	92,90	86,70	2,86	$<0,05$	90,50	2,44	Nesemnificativ

Se constată că mușchii gastrocnemieni excizați imediat după spinalizare conțin mai mult sodiu și mai puțin potasiu decît mușchii lotului normal, efect similar cu acela produs de excitarea lor electrică in situ. În schimb, mușchii excizați după două ore de la spinalizare conțin acești cationi în cantități corespunzătoare lotului normal, ceea ce denotă reversibilitatea procesului, cu restabilirea echilibrului ionic normal.

Datele privind acţiunea anesteziculuí asupra concentraţiei sodiului şi potasiului din muşchiul gastrocnemian sînt cuprinse în tabela 2.

Din analiza rezultatelor reiese că după două ore de la administrarea sării de sodiu a acidului N-metilciclohexenilmetilbarbituric (Evipan-sodiu) se produce o scădere a concentraţiei sodiului şi o creştere a concentraţiei potasiului, în comparaţie cu lotul martor. Avem deci o comportare diferită de cea semnalată în literatura de specialitate pentru o întrerupere a transmisiei nervoase (denervare) de peste 3—5 zile, care este însoţită, aşa cum s-a menţionat mai înainte, de o creştere a concentraţiei sodiului, respectiv o scădere a concentraţiei potasiului.

Tabela 2

Efectul anesteziei cu evipan asupra conţinutului în Na şi K din muşchiul gastrocnemian de broască

	Lot spinalizat (martor) Muşchi excizaţi după 3 ore	Lot anesteziat 300 mg evipan/kg corp Muşchi excizaţi după 2 ore		
Nr. determinări	12	14	Sd	P
mM Na/kg ţesut umed	11,7	8,0	0,92	<0,01
Nr. determinări	16	16	Sd	P
mM K/kg ţesut umed	84,5	93,9	2	<0,01

Modificările precoce puse în evidenţă după anestezia cu evipan nu pot fi explicate prin atrofierea muşchiului (4) (5) (6) şi nici prin creşterea permeabilităţii muşchiului pentru aceşti cationi sau prin slăbirea activităţii pompelor de sodiu şi potasiu (7), aşa cum s-a presupus în cazul denervărilor de lungă durată. După părerea noastră, modificările precoce survenite în urma anesteziei sau denervării de scurtă durată sînt determinate de perturbarea echilibrului ionic din muşchi. Într-adevăr, se ştie că muşchiul scheletic este în permanenţă sub influenţa unor stimuli emişi de sistemul nervos central. În condiţiile muşchiului inervat se stabileşte astfel un anumit echilibru biochimic care determină nivelul diferitelor componente din muşchi.

În lucrări anterioare s-a arătat că excitarea electrică sau spinalizarea determină deplasarea acestui echilibru în sensul scindării CrP (3), (15), în timp ce denervarea sau deprimarea transmisiei nervoase conduce la deplasarea în sens invers a echilibrului, deci la sinteza de CrP (3), (16).

O comportare asemănătoare se produce şi în cazul echilibrului ionic din muşchiul inervat. Excitarea electrică este însoţită de pătrunderea sodiului în muşchi, respectiv de ieşirea potasiului din muşchi (12),(17). Pe de altă parte, întreruperea de scurtă durată (1-3 zile) a transmisiei nervoase (8),(11) determină o ieşire a sodiului, respectiv o intrare a potasiului, deci o deplasare în sens contrar a echilibrului ionic iniţial.

Deprimarea transmisiei impulsurilor nervoase, produsă prin anestezia cu evipan, a determinat, ca și denervarea de scurtă durată, o deplasare a echilibrului ionic în același sens. Ar urma deci, în conformitate cu cele menționate anterior, ca excitarea in situ a mușchiului broaștei anesteziate să provoace o deplasare în sens invers a echilibrului ionic. Datele obținute confirmă această presupunere (tabela 3).

Tabela 3

Efectul excitării electrice in situ asupra conținutului în Na și K din mușchiul gastrocnemian de broască anesteziată 24 ore cu 300 mg evipan/kg corp

R = mușchi în repaos *E* = Mușchi simetric excitat cu 1500 imp 5 imp/s, 2 mA

	Nr. de determinări	R	E			
		$\bar{X}_1$	$\bar{X}_2$	$\bar{X}$	$S_{\bar{x}}$	P
mM Na/kg țesut umed	7	11,8	18,1	6,3	0,24	<0,01
mM K/kg țesut umed	7	82,4	78,8	3,6	0,53	<0,01

Modificările precoce puse în evidență în urma anesteziei cu evipan vin în sprijinul ipotezei cu privire la dependența dintre deprimarea de scurtă durată a transmisiei impulsurilor nervoase și modificarea echilibrului ionic în sensul scăderii concentrației sodiului și a creșterii concentrației potasiului în mușchiul striat.

CONCLUZII

Deprimarea de scurtă durată a transmisiei impulsurilor nervoase, obținută prin anestezia cu sarea de sodiu a acidului N-metilciclohexenil-metilbarbituric (Natrium-Evipan), determină scăderea concentrației sodiului, respectiv creșterea concentrației potasiului în mușchiul gastrocnemian de broască. Deplasarea acestor cationi în sens contrar aceleia produse de excitarea mușchiului, se datorează perturbării echilibrului ionic normal, ca urmare a întreruperii stimulilor permanenți emiși de sistemul nervos central.

Excitarea electrică in situ a mușchiului gastrocnemian de broască sub anestezie determină o deplasare a acestor cationi în sens invers, adică o îmbogățire a mușchiului în sodiu, respectiv o scădere a potasiu lui, în comparație cu mușchiul simetric neexcitat al animalului anesteziat.

Datele obținute de noi diferă deci de cele semnalate în literatură pentru o întrerupere a transmisiei nervoase de durată. În cazul din urmă, diferența de comportare se datorește probabil acțiunii diferiților factori ca de exemplu: atrofia mușchiului, creșterea permeabilității, etc.

Prezentat la redacție la:
20 septembrie 1974

Departamentul de biochimie
Institutul de științe biologice
București

EFFECT OF ANESTHESIA ON SODIUM AND KALIUM CONCENTRATIONS IN FROG GASTROCNEMIUS MUSCLE

SUMMARY

Precocious alteration in the ionic content of frog gastrocnemius muscle has been proved after anaesthesia with sodium salt of N-methyl-cyclohexenilmethylbarbituric acid (sodium-evipan).

Depression of nervous transmission by anesthesia determines diminution of sodium concentration and respectively, an increase of potassium concentration. These data are in contrast with those mentioned in literature, obtained after a denervation for a long time (more than 5 days). The significance of such a different behaviour is discussed.

BIBLIOGRAFIE

1. A. V. Palladin, R. Sigalova, Bull. Soc. Chim. Biol., **15**, 1263 (1933).
2. T. Amako, J. Koga, S. Nakayama, Y. Morishima, S. Yoshinaga, C. A., **54**, 21396 (1960).
3. T. Rădulescu, L. Scolnic, Rev. roum. Biochim., *1*, 191 (1964).
4. H. M. Hines, G. C. Knowlton, Am. journ. of physiology, **104**, 379 (1933).
5. F. L. Humoller, B. Griswold, A. R. Mc. *Intuire*, J. gen. phisiol., **33**, 723 (1950).
6. Z. Drahota, *The denervated muscle*, Chapter VI. Edited by E. Gutmann, Prague 1962.
7. T. Kovács, Agnes Vissy, Erzsébet Went, Acta physiol. Hung., **33**, 55 (1968).
8. D. Cotariu, T. Rădulescu, St. cerc. biochim., **10**, 111 (1967).
9. I. C. Dreyfus, M. Joly, G. Schapira, L., Raeber, C. R. Acad. Sc., **236**, 2351 (1953).
10. Prudent Padieu, Bull. Soc. chim. Biol., **41**, 57 (1959).
11. T. Rădulescu, D. Cotariu, Rev. Roum. Biochim., **2**, 343 (1965).
12. D. Cotariu, T. Rădulescu, St. cerc. biochm., **9**, 277 (1966).
13. B. H. Steinbach, J. Gen. Physiol., **44**, 1131 (1961).
14. E. Macovschi, T. Rădulescu. L. Scolnic, St. cerc. biochim. **5**, 485 (1962).
15. E. Macovschi, C.Iordache, St. cerc. biochim., **5**, 207 (1962).
16. T. Rădulescu, D. Cotariu, Rev. roum. Biochim., **2**, 63 (1965).
17. I. M. Gillis, Arch. Int. Physiol. Biochim., **72**, 124 (1964).

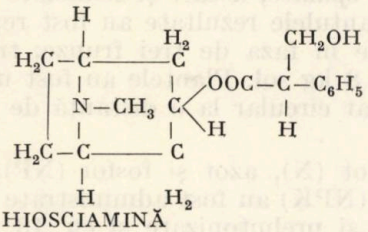
ST. CERC. BIOCHIM., 19, 1, 101–107 (1976)

INFLUENȚA NUTRIȚIEI MINERALE ASUPRA CONȚINUTULUI ÎN ALCALOIZI TROPANICI DIN *DATURA INNOXIA*

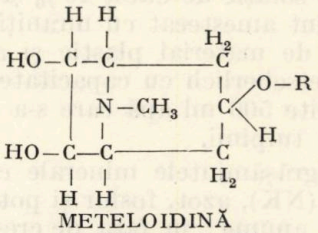
H. D. SCHELL, MIOARA CÂRSTEANU, A. NASTA, IRINA CORNOIU, OFELIA GOZIA și TR. BENȚIA

Rezumat. — În lucrarea de față autorii au studiat repartiția alcaloizilor tropanici în diferite organe de *Datura innoxia* în funcție de nutriția minerală și de timpul de recoltare a plantelor. Cantitățile cele mai mari din acești alcaloizi au fost găsite în rădăcini, frunze și florile recoltate împreună cu fructele tinere, în special la variantele crescute în prezență de azot. Efectele cele mai bune ale nutriției minerale asupra conținutului în alcaloizi tropanici se constată de regulă la timpul 1 și 2 de recoltare. În florile recoltate împreună cu fructe foarte tinere s-a semnalat prezența unui al 4-lea alcaloid, neidentificat.

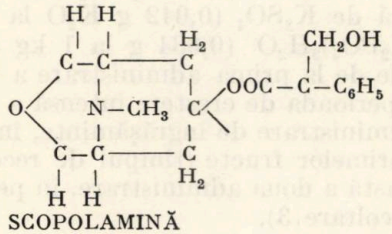
O plantă producătoare de alcaloizi conține în majoritatea cazurilor nu numai un singur alcaloid, ci de obicei un amestec mai mult sau mai puțin complex de baze azotoase. În acest amestec se deosebesc, în funcție de cantitatea lor, alcaloizi principali și alcaloizi secundari. Se știe însă că în diferite specii, ale aceluia și gen, dar chiar și în cadrul aceleeași specii, recoltată însă din locuri diferite, baza care apare ca principală poate fi diferită. Cantitatea relativă a fiecărui alcaloid în parte poate varia chiar și în cursul evoluției ontogenetice la una și aceeași plantă. Genurile de Datura și Atropa de pildă, conțin ca alcaloid principal hiosciamină și scopolamină. Unele specii de Datura mai conțin și un al 3-lea alcaloid principal meteloidina. *Atropa beladona* este considerată prin excelență ca o plantă hiosciaminică. Hiosciamina este preponderentă, de asemenea și în unele varietăți de *Datura stramonium*, în timp ce speciile *D. metel*,



HIOSCIAMINĂ



METELOIDINĂ
(R=ACID TIGLIC)



SCOPOLAMINĂ

D. innoxia, *D. meteloides* şi *D. ferox* conţin mai ales scopolamină. Aceste date sînt valabile însă numai pentru planta adultă. În cazul plantelor tinere (în vîrstă de cîteva săptămîni) ale tuturor acestor specii de Datura, dar chiar şi în cazul plantelor tinere hiosciaminice, s-a putut constata o preponderenţă a scopolaminei (1), (2), (3).

Capacitatea de a sintetiza scopolamina, care reprezintă de fapt epoxidul hiosciaminei, este deci pe de o parte condiţionată genetic, iar pe de altă parte pare să fie dependentă şi de activitatea meristemului.

Problemele legate de repartizarea alcaloizilor în diferitele organe ale plantei, de momentul apariţiei lor în cursul dezvoltării stadiale ale plantei, precum şi cele legate de modificările chimice cărora le sînt supuşi alcaloizii sînt deosebit de importante pentru studiul biosintezei acestora. Izolarea şi determinarea separată a fiecăruia dintre alcaloizii principali şi secundari, adesea foarte înrudiţi între ei, este în majoritatea cazurilor destul de dificilă.

Pentru detectarea concomitentă a alcaloizilor tropanici cum sînt: atropina, hiosciamina, scopolamina au fost elaborate o serie de metode mai mult sau mai puţin laborioase. Klein şi Sonnleitner (4) de pildă, au apelat în acest scop la cristalografie iar Kirkpatrick (5) la polarografie. Cromatografia de adsorbţie a fost folosită de Evans şi Partrige (6), în timp ce Munier şi Macheboef (7), Brindle, Carless şi Woodhead (8) au recurs la cromatografia pe hîrtie. Romeike (9) testează o serie de metode şi tipuri de hîrtie obţinînd cele mai bune separări cu metoda cromatografică cu hîrtie sub formă de rondele, propusă de Rutter (10), folosind hîrtia firmei Schleicher & Schüll nr. 2043b. Pentru determinarea alcaloizilor din *Datura innoxia*, am apelat în lucrarea de faţă la metoda lui Romeike.

MATERIAL ŞI METODE

Seminţele de *Datura innoxia* var. Sud, au fost tratate timp de 12 ore cu o soluţie de $CaCl_2$ 10% şi apoi spălate, uscate şi semănate în lădiţe cu pămînt amestecat cu mraniţă. Plantulele rezultate au fost repicate în ghivece de material plastic şi ajunse în faza de trei frunze, trecute în vase Mietscherlich cu capacitatea de 8 kg sol. Plantele au fost udate zilnic cu cîte 500 ml apă care s-a aplicat circular la o distanţă de 7—8 cm de baza tulpinii.

Îngrăşămintele minerale cu azot (N), azot şi fosfor (NP), azot şi potasiu (NK), azot, fosfor şi potasiu (NPK) au fost administrate în două etape şi anume: în faza de creştere şi prebutonizare şi cu 13 zile mai tîrziu în faza de înflorire şi formare a primelor capsule. Administrarea azotului a fost făcută sub formă de NH_4NO_3 (0,103 g N activ la 1 kg sol), potasiu sub formă de K_2SO_4 (0,042 g K_2O la 1 kg sol) şi fosforul sub formă de $Ca(H_2PO_4)_2H_2O$ (0,034 g la 1 kg sol). Recoltările au fost făcute după 10 zile de la prima administrare a îngrăşămîntului (timpul de recoltare 1) în perioada de creştere intensă a frunzelor, apoi după 10 zile de la a doua administrare de îngrăşăminte, în perioada de înflorire în masă şi formare a primelor fructe (timpul de recoltare 2) şi în sfîrşit, după 27 zile de la această a doua administrare, în perioada de fructificare în masă (timpul de recoltare 3).

Determinarea alcaloizilor s-a făcut după metoda cromatografică indicată de Romeike (9). Cantitatea extractului a fost cuprinsă între 0,0025 —0,02 ml și variază în funcție de concentrația alcaloidului din extractul vegetal. Punerea în evidență a alcaloizilor de pe cromatograma rezultată se face prin pulverizarea sau imersarea acesteia în reactivul Dragendorff modificat de Munier (11).

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Din analiza cromatogramelor și din datele centralizate (tabelele 1—5) rezultă că cantitatea de scopolamină din *Datura innoxia* variază în funcție de organul și de nutriția minerală a plantei. Astfel, în timp ce în rădăcini se găsesc cantități relativ mari de scopolamină (tab. 1), acest alcaloid este practic absent în tulpină (tab. 2). Aceste date găsite de noi vin să confirme datele lui James și Thewlis (12) care susțin pe baza unor experiențe de altoire efectuate pe *Atropa beladona* și *Datura innoxia* că locul de formare al alcaloizilor ar fi rădăcina, iar tulpina ar accepta în mod pasiv alcaloidul care urcă din rădăcini în plantă. Într-adevăr, din numeroasele lucrări publicate în literatura de specialitate

Tabela 1

Conținutul în scopolamină, hiosciamină și meteloidină a rădăcinilor de *Datura innoxia* cultivată în diferite condiții de nutriție minerală

Nr. crt.	Varianta	Scopolamină	Hiosciamină	Meteloidină
1	C_1	++	+	−
2	C_2	+	−	+
3	C_3	±	−	+
4	N_1	+++	+	+
5	N_2	++	+	+
6	N_3	±	+	+
7	NK_1	++	+	+
8	NK_2	+	+	+
9	NK_3	+	+	+
10	NP_1	++	+	+
11	NP_2	+	+	+
12	NP_3	+	−	−
13	NPK_1	+	+	+
14	NPK_2	+	+	+
15	NPK_3	+	+	+

Semnificația simbolurilor din tabelele 1—5
C = martor
N = nutriția cu azot
NK = nutriție cu azot + potasiu
NP = nutriția cu azot + fosfor
NPK = nutriția cu azot + fosfor + potasiu
Indicii 1, 2, 3 — reprezintă timpii de recoltare a materialului vegetal după aplicarea nutriției minerale.
− = absență de alcaloid
± = urme de alcaloid
+; ++; +++ = cantități crescinde de alcaloid.

se ştie că la o serie de plante producătoare de alcaloizi, locul principal de biosinteză a acestora este rădăcina. Acest fapt este valabil mai ales şi pentru o serie de plante producătoare de alcaloizi tropanici. Cantităţi relativ crescute de scopolamină se găsesc în majoritatea variantelor, în frunze (tab. 3) şi în florile recoltate împreună cu fructele tinere (tab. 4). Cantităţi relativ scăzute de scopolamină am găsit în capsule (tab. 5).

Tabela 2

Conţinutul în scopolamină, hiosciamină şi meteloidină a tulpinilor de *Datura innoxia* cultivată în diferite condiţii de nutriţie minerală

Nr. crt.	Varianta	Scopolamină	Hiosciamină	Meteloidină
1	C_1	−	−	−
2	C_2	−	−	−
3	C_3	−	−	−
4	N_1	+++	−	−
5	N_2	++	−	+
6	N_3	−	−	−
7	NK_1	−	+	−
8	NK_2	−	−	−
9	NK_3	−	−	−
10	NP_1	+	−	−
11	NP_2	−	−	−
12	NP_3	−	−	−
13	NPK_1	−	+	+
14	NPK_2	−	+	+
15	NPK_3	−	−	−

Tabela 3

Conţinutul în scopolamină, hiosciamină şi meteloidină a frunzelor de *Datura innoxia* cultivată în diferite condiţii de nutriţie minerală

Nr. crt.	Varianta	Scopolamină	Hiosciamină	Meteloidină
1	C_1	−	+	+
2	C_2	+	−	+
3	C_3	+	−	−
4	N_1	−	−	−
5	N_2	+++	−	−
6	N_3	++	+	+
7	NK_1	+	+	+
8	NK_2	++	−	+
9	NK_3	−	−	−
10	NP_1	±	+	+
11	NP_2	++	+	+
12	NP_3	+	+	+
13	NPK_1	+	+	+
14	NPK_2	+	+	+
15	NPK_3	++	+	+

Tabela 4

Conținutul în scopolamină, hiosciamină și meteloidină a florilor recoltate împreună cu fructe foarte tinere de *Datura innoxia*, cultivată în diferite condiții de nutriție minerală

Nr. crt.	Varianta	Scopolamină	Hiosciamină	Meteloidină	Alți alcaloizi
1	C_2	+	+	+	prezenți
2	N_2	++	+	+	prezenți
3	NK_2	+++	+	+	prezenți
4	NP_2	+++	+	+	—
5	NPK_2	±	+	+	—

Tabela 5

Conținutul în scopolamină, hiosciamină și meteloidină a capsulelor de *Datura innoxia* cultivată în diferite condiții de nutriție minerală

Nr. crt.	Varianta	Scopolamină	Hiosciamină	Meteloidină
1	C_3	+	—	—
2	N_3	+	—	—
3	NK_3	+	—	—
4	NP_3	++	—	—
5	NPK_3	±	—	—

În ceea ce privește influența prezenței diferitelor componente minerale în soluțiile nutritive asupra cantității scopolaminei din diferitele organe ale plantei, se constată, în general, o influență pozitivă marcată de azot, mai ales în cazul rădăcinilor și frunzelor dar chiar și în cazul tulpinei unde scopolamina a fost găsită prezentă doar la această variantă. O cantitate crescută de scopolamină am găsit și la folosirea combinată a azotului cu potasiu și a azotului cu fosforul, mai ales la rădăcini, frunze și flori recoltate împreună cu fructele tinere. Folosirea concomitentă a N,P și K în soluțiile nutritive, practic nu se repercutează asupra conținutului în scopolamină față de martor. În ceea ce privește timpul de recoltare a materialului vegetal pentru dozarea scopolaminei se constată de regulă o cantitate relativ crescută a acestui alcaloid la timpii de recoltare 1 și 2. La timpul de recoltare 3, unde materialul vegetal a fost recoltat după o perioadă mai lungă de la aplicarea amestecului nutritiv, efectul acestuia a fost practic inexistent. Interesant de amintit este faptul că în majoritatea variantelor de rădăcini și frunze și la absolut toate variantele de la florile recoltate împreună cu fructele tinere sînt prezenți și alcaloizii hiosciamină și meteloidină. Acești alcaloizi lipsesc însă cu desăvîrșire din capsule și sînt prezente doar sporadic la extractele obținute din tulpini. Semnalăm de asemenea prezența unui al 4-lea alcaloid, neidentificat, în extractele obținute din florile recoltate împreună cu fructele foarte tinere atît la plantele martor cît și la cele cultivate în prezență de N și N + K fapt care nu s-a putut observa la celelalte organe studiate. R_f-ul său este 0,17.

CONCLUZII

1. Cantităţile scopolaminei determinate cromatografic în extractele diferitelor organe de la *Datura innoxia* variază în funcţie de organul plantei, de regimul ei de nutriţie minerală şi de perioada care s-a scurs de la aplicarea nutriţiei şi pînă la recoltarea materialului vegetal.

2. Cantităţile cele mai mari de scopolamină au fost găsite în rădăcini, frunze şi în florile recoltate împreună cu fructele tinere. Cantităţi mai reduse au fost găsite în capsule. În tulpinile plantei scopolamina este practic absentă.

3. Se constată, în general, o cantitate mărită de scopolamină la variantele crescute în prezenţă de N. La aceste variante scopolamina apare chiar şi în tulpină. Se constată de asemenea o creştere a cantităţii de scopolamină în urma nutriţiei combinate N + K şi N + P, mai ales în cazul rădăcinilor, frunzelor şi florilor recoltate împreună cu fructele tinere. O administrare concomitentă a celor trei componente nu duce la o creştere a conţinutului în scopolamină.

4. Efectele cele mai bune ale nutriţiei minerale se constată de regulă la timpul 1 şi 2 de recoltare. La timpul 3 de recoltare practic nu se observă nici un efect, cantităţile de scopolamină fiind de obicei cele mai scăzute.

5. În cazul rădăcinilor şi frunzelor se observă, în marea majoritate a variantelor, prezenţa şi a alcaloizilor hiosciamină şi meteloidină. Aceşti doi alcaloizi nu lipsesc niciodată din extractele obţinute din florile recoltate împreună cu fructele tinere, dar nu au putut fi identificaţi în capsulele plantei.

6. Cromatogramele obţinute din extractele florilor recoltate împreună cu fructele foarte tinere indică, spre deosebire de toate celelalte organe studiate şi prezenţa unui al 4-lea alcaloid neidentificat, cu excepţia variantelor, unde la nutriţia minerală s-a folosit şi fosfor.

Prezentat la redacţie
la 18 septembrie 1975

Institutul de ştiinţe biologice Bucureşti
Departamentul de biochimie

THE INFLUENCE OF MINERAL NUTRITION ON THE AMOUNT OF TROPANE ALKALOIDS IN *DATURA INNOXIA*

SUMMARY

The authors report in this paper the repartition of tropane alkaloids in different organs of *Datura innoxia*, as a function of mineral nutrition, and the moment of plant harvesting. The highest amount of these alkaloids was found in roots, leaves and flowers harvested along with young fruits, particularly in the samplings grown in the presence of nitrogen. The best effects of mineral nutrition on the tropane alkaloids content were found at the steps 1 and 2 of harvesting. A fourth alkaloid, unidentified yet, was detected in the flowers harvested together with young fruits.

BIBLIOGRAFIE

1. R. Hegnauer, Pharmac. Weekbl., **86**, 805 (1951).
2. W. C. Evans, M. W. Partridge, J. Pharm. Pharmacol., **5**, 772 (1953).
3. A. Romeike, Pharmazie, **8**, 668 (1953).
4. G. Klein, H. Sonnleitner, Österr. Bot. Ztschr., **78**, 9 (1929).
5. M. F. W. Kirkpatrick, Quant. J. Pharm. Pharmacol., **19**, 526 (1946).
6. W. C. Evans, M. W. Partridge, Quant. J. Pharm. Pharmacol., **21**, 126 (1948).
7. R. Munier, M. Macheboef, Bul. Soc. Chim. Biol., **32**, 192 (1950).
8. H. Brindle, J. E. Carles, H. B. Woodhead, J. Pharm. Pharmacol., **3**, 793 (1951).
9. A. Romeike, Flora, **143**, 67 (1956).
10. L. Rutter, Nature (London), **161**, 435 (1948).
11. R. Munier, Bul. Soc. Chim. Biol., **35**, 1225 (1953).
12. W. O. James, B. H. Thewlis, New Phytolog., **51**, 250 (1952).

ST. CERC. BIOCHIM., 19, 1, 109–112 (1976)

CONJUGATELE MIOZINEI CU CH- ŞI AH-SEPHAROSE 4 B

HORST D. SCHELL, IRINA CORNOIU şi TRAIAN BENŢIA

Rezumat. Se descrie prepararea şi proprietăţile miozinei insolubilizate prin legarea ei covalentă de CH- şi AH-Sepharose 4 B. Conjugatele obţinute prezintă o activitate ATP-azică reziduală de 15%, respectiv 33% şi îşi păstrează activitatea lor catalitică şi după refolosiri repetate.

Legarea enzimelor de suporturi macromoleculare insolubile permite realizarea unor modele experimentale adecvate pentru studiul proprietăţilor fizico-chimice şi cinetice ale enzimelor în condiţii mai apropiate cu cele existente in vivo, mai ales pentru acele enzime care se găsesc în mod normal legate în organism de diferite structuri celulare sau subcelulare. Una dintre aceste enzime este şi miozina (ATP-fosfohidrolază, EC 3.6.1.3), singura proteină musculară fibrilară cu activitate enzimatică şi cu rol important în contracţia musculară.

Într-o lucrare anterioară (1) am descris proprietăţile fizico-chimice şi cinetice ale acestei enzime insolubilizată prin legarea ei covalentă direct de molecula agarozei activată cu BrCN. Preparatul enzimatic insolubil obţinut prezenta o activitate ATP-azică ridicată care se păstra şi după refolosiri repetate. În această lucrare prezentăm proprietăţile miozinei insolubilizate prin legarea ei covalentă nu direct de molecula agarozei, ci prin intermediul unor braţe („spacer") hexametilenice, cu scopul de a vedea dacă şi în ce măsură intervin factorii sterici asupra comportării miozinei legată de suport. Derivaţii de sinteză ai agarozei folosiţi în acest scop şi anume CH- şi AH-Sepharose 4 B (Pharmacia Fine Chemicals AB, Uppsala, Suedia), oferă totodată şi posibilitatea de a urmări influenţa modului de legare a enzimei de suport asupra proprietăţilor ei catalitice în funcţie de gruparea funcţională implicată în legătura covalentă, adică dacă legătura se realizează prin grupările aminice (în cazul CH-Sepharozei) sau prin cele carboxilice (în cazul AH-Sepharozei) din molecula enzimei.

MATERIAL ŞI METODE

Miozina necesară cercetărilor noastre a fost extrasă din muşchi striaţi (gastrocnemian) de iepure după indicaţiile date de S.V. Perry (2). Determinarea activităţii ATP-azice a miozinei obţinute s-a efectuat în mod clasic prin dozarea colorimetrică a fosforului anorganic eliberat de enzimă din ATP în prezenţă de ioni de calciu, după metoda lui Fiske şi Subbarow (3).

Cuplarea miozinei de derivaţii agarozei s-a realizat astfel: 1 g CH- sau AH-Sepharose 4 B se suspendă pentru umflare în 25 ml soluţie de NaCl 0,5 M. După cîteva ore se spală gelul obţinut (4 ml) pe o pîlnie

Büchner la trompă de apă cu 200 ml soluție de NaCl 0,5 M pentru îndepărtarea lactozei și a dextranului adăugate produselor de firma producătoare în cursul procesului tehnologic și apoi cu apă distilată pentru îndepărtarea clorurii de sodiu. Gelul spălat se trece apoi într-o capsulă împreună cu 3 ml de miozină (concentrația proteică 32 mg/ml) și 160 mg clorhidrat de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimidă (Merck-Schuchardt, Höhenbrunn bei München, R.F.G.) dizolvat în 3 ml soluție de KCl 0,5 M și se agită electromagnetic timp de 6 ore, la temperatura camerei, în capsulă acoperită. Produsul de cuplare rezultat se spală pe o pîlnie Büchner la trompă de 5—6 ori cu cîte 40—50 ml soluție de KCl 0,5 M, pînă la îndepărtarea completă a miozinei nelegate, se suspendă în 25 ml soluție tampon glicocol de pH 9,1 și se păstrează la rece pînă la folosire.

Cantitatea de miozină legată de suport s-a determinat prin dozarea azotului dintr-o cantitate cunoscută de conjugat după kjeldahlizare, scăzînd din valoarea obținută cantitatea azotului a suportului fără miozină.

Determinarea activității ATP-azice a miozinei legate s-a realizat ca și în cazul miozinei libere, cu singura deosebire că stoparea reacției enzimatice nu s-a făcut prin adăogarea de acid tricloracetic, ci prin îndepărtarea miozinei legate din amestecul de reacție prin simplă filtrare la trompă. Miozina insolubilizată poate fi folosită apoi într-o nouă reacție după o prealabilă spălare cu soluția de tampon glicocol.

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Extractele de miozină obținute de noi din mușchiul gastrocnemian de iepure prezentau concentrații proteice cuprinse între 30—35 mg proteină/ml extract și aveau o activitate ATP-azică situată între 0,120—0,180 μmoli P_i/min/mg proteină.

Datele obținute la determinarea cantității de miozină legată de suport au arătat că 1 ml gel de CH-Sepharose 4 B, leagă, în condițiile noastre de lucru, în medie 12,8 mg miozină, iar 1 ml gel de AH-Sepharose 4 B 9,8 mg. Această diferență este normală și ușor de explicat dacă se ține cont de conținutul în grupări active al celor două suporturi. Astfel, în timp ce CH-Sepharose 4 B posedă o capacitate situată între 10—14 μmoli/ml, AH-Sepharose 4 B are o capacitate cuprinsă doar între 6—10 μmoli/ml. Raportînd concentrațiile proteice găsite la media numărului de grupări active (μmoli/ml gel) de la fiecare suport în parte, diferența observată practic dispare.

Dacă se determină însă activitatea ATP-azică a celor două conjugate de miozină, se constată că în timp ce preparatul obținut cu CH-Sepharose 4 B posedă o activitate ATP-azică de 0,026 μmoli P_i /min/mg proteină, ceea ce corespunde la o activitate reziduală de 15%, produsul obținut de la AH-Sepharose 4 B are o activitate de 0,056 μmoli P_i /min/mg proteină, ceea ce corespunde la o activitate reziduală de 33% în comparație cu enzima liberă (0,170 μmoli P_i/min/mg proteină). Aceste activități sînt asemănătoare cu cele obținute și de alți autori la legarea miozinei de suporturi și prin metode care diferă de ale noastre. Astfel, Patel și colab. (4) au obținut preparate de miozină insolubilizată cu activitate ATP-azică reziduală cuprinsă între 16—26% prin legarea încrucișată a miozinei cu

acid poli-L-alanin-L-glutamic, poligalacturonic, poliaspartic şi CM-celuloză, în prezenţă de N-etil-5-fenoxazoliu-3-sulfonat. Brown şi colab. (5) descriu un preparat cu activitate reziduală de 23%, obţinut prin cuplarea miozinei de CM-celuloză sub formă de azidă. Activităţi reziduale mai mari (45%) au fost observate la preparatele obţinute prin înglobarea mecanică a miozinei în gel de poliacrilamidă (6).

Diferenţa observată de noi la activitatea enzimatică specifică reziduală a celor două conjugate de miozină pare a fi determinată de modul de legare al enzimei de suport. Astfel, se poate observa că la miozina cuplată prin grupările ei carboxilice de suport (cazul AH-Sepharose 4 B) activitatea reziduală specifică este dublă faţă de cea observată la miozina legată prin intermediul grupărilor aminice din molecula ei (cazul CH-Sepharozei 4 B). Înseamnă că, în acest din urmă caz, în legăturile covalente dintre enzimă şi suportul insolubil sînt angajate grupări funcţionale importante pentru activitatea catalitică a enzimei. Aceste grupări pot fi direct implicate în activitatea enzimatică sau situate în apropierea centrului activ, mascîndu-l prin legarea lor de matricea suportului. În sprijinul acestei afirmaţii vine mai ales faptul că CH-Sepharose 4 B poate lega proteinele în prezenţă de carbodiimidă şi prin intermediul grupărilor tiolice, cu formare de esteri tiolici. Or, este bine cunoscut rolul principal pe care-l joacă funcţia tiolică în molecula miozinei în activitatea ei enzimatică (7), (8).

Se constată totodată că preparatele descrise în prezenta lucrare au totuşi o activitate enzimatică reziduală relativ scăzută în comparaţie cu preparatele insolubile ale miozinei obţinute prin legarea ei covalentă, direct de molecula agarozei. Credem că acest fapt se datoreşte mai puţin distanţării moleculei miozinei de scheletul agarozei prin acele braţe hexametilenice, ci mai degrabă unei aglomerări prea mari de molecule de miozină pe suprafaţa suportului care poate duce, după cum se ştie şi din literatură (9), la o reducere a activităţii enzimatice datorită unor împiedicări sterice. Cantitatea de proteină legată în cazul conjugatului miozinei cu agaroză activată cu BrCN este de trei ori mai mică (1), iar la un produs similar obţinut de noi de la β-amilază (10), de asemenea foarte activ, chiar de şapte ori mai redusă decît în cazul de faţă.

Conjugatele miozinei cu CH- şi AH-Sepharose 4 B îşi păstrează activitatea lor specifică şi după repetate refolosiri şi pot fi folosite în studii de cinetică enzimatică în prezenţă de activatori şi inhibitori în condiţii de sistem eterogen.

CONCLUZII

Prin fixarea covalentă a miozinei extrase din muşchi striaţi de iepure de CH- şi AH-Sepharose 4 B se obţin preparate enzimatice insolubile care îşi păstrează 15%, respectiv 33% din activitatea ATP-azică a miozinei libere. Conjugatele obţinute practic nu-şi modifică activitatea lor catalitică nici după mai multe refolosiri consecutive.

Prezentat la redacţie
la 31 decembrie 1974

Departamentul de biochimie
Institutul de ştiinţe biologice
Bucureşti

MYOSÍNE CONJUGATES WITH CH- and AH-SEPHAROSE 4 B

SUMMARY

The preparation and properties of myosine insolubilized by covalent binding on CH- and AH-Sepharose 4 B are reported. The resulting products show a residual ATP-ase activity of 15% and 33%, respectively, and they preserve their catalytic activity after repeated use.

BIBLIOGRAFIE

1. H. D. Schell, I. Cornoiu, Tr. Benția, Rev. roum. Biochim., **11**, 151 (1974).
2. S. V. Perry în *Methods in Enzymology*, Academic Press, Inc. Publishers, New York, 1955, **2**, pag. 582.
3. C. H. Fiske, Y. Subbarow, J. Biol. Chem., **66**, 375 (1925).
4. A. B. Patel, S. N. Pennington, H. D. Brown, Biochim. Biophys. Acta, **178**, 626 (1969).
5. H. D. Brown, S. K. Chattopadhyay, A. B. Patel, Biochim. Biophys. Res. Commun., **25**, 304 (1966).
6. H. D. Brown, A. B. Patel, S. K. Chattopadhyay, J. Biomed. Mater. Res., **2**, 231 (1968).
7. W. W. Kielley, M. Kimura, J. P. Cooke, VI-th Int. Congr. Biochem., New York, 1964, Abstr. VIII, p. 634.
8. S. V. Perry, J. Cotteriu, Nature, **205**, 161 (1965).
9. * * * *CNBr-activated Sepharose 4 B for immobilization of biopolymers*, broșură editată de firma Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Suedia, 1970.
10. H. D. Schell, I. Cornoiu, M. A. Mateescu, Rev. roum. Biochim., **11**, 199 (1974).

ST. CERC. BIOCHIM., 19, 1, 113–119 (1976)

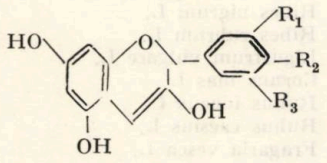
IDENTIFICAREA CROMATOGRAFICĂ A ANTOCIANIDINELOR ŞI ANTOCIANOZIDELOR DIN FLORILE ŞI FRUCTELE UNOR PLANTE INDIGENE

M. TĂMAŞ şi STELIANA STOLERIU

Rezumat. — S-a studiat separarea şi identificarea cromatografică a antocianidinelor şi antocianozidelor din florile şi fructele a 24 specii de plante indigene. Se indică cele mai adecvate tehnici pentru separarea cromatografică a celor două tipuri de compuşi şi se identifică unele antocianidine. Pentru fiecare drog se precizează numărul de spoturi, valoarea *Rf* şi culoarea dată pe cromatogramă, ceea ce constituie un caracter de recunoaştere a provenienţei antocianilor din produse sau extracte vegetale.

Antocianii sînt pigmenţi derivaţi de 2-fenil-α-cromonă ce dau culoarea roşie, albastră sau violetă florilor şi fructelor. În natură se găsesc diverse tipuri de antociani, dintre care trei însă sînt fundamentale, şi anume : pelargonidina, cianidina şi delphinidina, ce se deosebesc între ele prin numărul grupelor OH de pe nucleul fenilic. Alte antocianidine cunoscute sînt eteri metilici ai celor trei tipuri menţionate (1)—(4).

În legătură cu semnificaţia biologică a antocianilor, unii autori afirmă că aceşti pigmenţi ar constitui un mijloc de apărare a plantelor faţă de bolile criptogamice, dar nu întotdeauna acţiunea antibiotică se datoreşte compuşilor coloraţi (3) (5).



$R_1 = R_3 = H$; $R_2 = OH$: pelargonidina
$R_1 = R_2 = OH$; $R_3 = H$: cianidină
$R_1 = R_2 = R_3 = OH$: delphinidină
$R_1 = R_3 = OCH_3$; $R_2 = OH$: malvidină
$R_1 = OCH_3$; $R_2 = R_3 = OH$: petunidină
$R_1 = OCH_3$; $R_2 = OH$; $R_3 = H$: paeonidină

Din punct de vedere medicinal s-a demonstrat că preparatele pe bază de antociani sînt dotate cu activitate specifică de vitamină P, dînd rezultate favorabile în tulburările circulatorii, în fragilitatea şi permeabilitatea capilară. În oftalmologie antocianozidele prezintă o acţiune favorabilă în terapia retinopatiilor, miopiei şi hemeralopiei (6)—(10).

Unele flori şi fructe bogate în antociani, sau extracte din ele se întrebuinţează în industria alimentară, pentru colorarea băuturilor alcoolice şi răcoritoare, a unor produse zaharoase, fiind coloranţi lipsiţi de toxicitate, ieftini şi accesibili (11). Se cunosc şi cazuri de falsificare a vinurilor roşii cu extracte din fructe de soc, afin, viţă de Canada sau coacăz negru.

Cunoscînd importanţa medicinală şi tehnico-tinctorială a antocianilor, ne-am propus să studiem comportamentul cromatografic atît al agliconilor (antocianidine, antocianidoli) cît şi al glicozidelor (antocianozide)

din florile și fructele celor mai răspîndite și mai frecvent utilizate specii de plante indigene. Am urmărit să punem în evidență numărul de pigmenți separați în diferite sisteme de solvenți și pe diferite substrate adsorbante, valoarea Rf și culoarea petelor.

Pentru antocianidine, ne-am propus să identificăm și principalele tipuri din speciile pe care le-am studiat, pe baza valorii Rf cunoscute din literatură, sau din drogurile în care diferiții antociani sînt citați (1)(4)(6)(8).

Luînd în studiu un număr mare de droguri, am urmărit să redăm și un tablou comparativ al antocianilor conținuți în aceste droguri, care să poată ajuta la o mai ușoară identificare a provenienței lor.

Datele din literatura de specialitate remarcă rezultatele superioare obținute prin diferitele variante ale cromatografiei, în separarea pigmenților antocianici. Mai frecvent sînt utilizate cromatografia pe hîrtie (12)—(19), pe strat subțire de silicagel (20)(21), cromatografia pe coloană de celuloză (22)(23) și, mai recent, prin focalizarea izoelectrică pe coloane conținînd amfoliți (24).

MATERIAL ȘI METODE

S-au studiat antocianii proveniți de la 24 specii de plante indigene, dintre care de la 12 specii am analizat florile și de la alte 12 specii fructele (tab.1).

Tabela 1

Speciile de plante de la care au fost analizați antocianii

FLORI		FRUCTE	
Nr.	Specia	Nr.	Specia
1	Salvia splendens Ker.	1	Vaccinium myrtillus L.
2	Petunia hybrida Hort.	2	Ribes nigrum L.
3	Pelargonium zonale (L.) Ait.	3	Ribes rubrum L.
4	Centaurea cyanus L.	4	Ligustrum vulgare L.
5	Althaea rosea (L.) Cav.	5	Cornus mas L.
6	Malva neglecta Wallr.	6	Rubus idaeus L.
7	Delphinium consolida L.	7	Rubus caesius L.
8	Delphinium orientale Gay.	8	Fragaria vesca L.
9	Paeonia officinalis L.	9	Parthenocissus quinquefolia (L.) Planch
10	Paeonia tenuifolia L.	10	Sambucus nigra L.
11	Papaver rhoeas L.	11	Sambucus ebulus L.
12	Rosa rugosa Thunb.	12	Vitis vinifera L.

Florile, după recoltare, au fost uscate și apoi măcinate iar fructele au fost conservate în metanol la rece și întuneric.

Pentru studiul antocianidinelor s-au tratat 0,5 g pulbere de flori cu metanol (10 ml) și 5 ml HCl 2N. Pentru fructele conservate în metanol s-au utilizat 10 ml extract 5% la care s-a adăugat 5 ml HCl 2N. Acestea s-au menținut în baloane Erlenmayer de 50 ml, prevăzute cu o pîlnie mică drept refrigerent, pe baia de apă în fierbere, timp de 40 min. După răcire s-au îndepărtat flavonele cu acetat de etil, iar antocianidinele rezultate în urma hidrolizei, s-au extras cu n-butanol.

Pentru analiza antocianozidelor am folosit 0,5 g pulbere de flori pe care am extras-o la rece, prin mojarare, cu metanol acidulat cu 0,01% HCl, iar în cazul fructelor am folosit soluţia extractivă 5% în metanol, la care am adăugat, de asemenea, 0,01% HCl.

Pentru antocianidine am utilizat, la început, cromatografia pe hîrtie, pe strat subţire de silicagel şi poliamid. Dintre acestea, cele mai bune rezultate le-am obţinut pe hîrtie cromatografică Whatman 1, în sistemul Forestal pentru agliconi : acid acetic-acid clorhidric-apă (30: 3: 10).

Am început analiza calitativă a antocianilor cu studiul identificării antocianidinelor, deoarece este cunoscut că acestea se separă mai uşor prin cromatografie decît glicozidele lor, iar în urma rezultatelor obţinute putem să verificăm în ce măsură tehnica cromatografică utilizată pentru antocianozide este cea mai adecvată, cunoscînd că numărul glicozidelor trebuie să fie mai mare sau cel puţin egal cu al agliconilor.

Pentru studiul antocianozidelor am utilizat atît cromatografia pe hîrtie (neimpregnată şi impregnată cu octanol), precum şi cromatografia pe strat subţire de silicagel H şi poliamid. În acest caz cele mai bune rezultate le-am obţinut prin cromatografia pe strat subţire de silicagel H (Merck), folosind sistemul de solvenţi : acetat de etil-metil etil cetonă-acid formic-apă (5: 3: 3: 1) (20). Această tehnică are şi avantajul de a fi rapidă, necesitînd un timp de aprox. 30 min pentru o migrare de 10 cm.

Pe linia de start am aplicat aceeaşi cantitate de soluţie extractivă, din fiecare drog, în spoturi liniare de 5 cm lăţime pe hîrtie şi 2 cm pe stratul de silicagel. Identificarea am făcut-o la lumina zilei, imediat după uscarea cromatogramei.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Din analiza cromatogramelor pentru antocianidine (fig. 1 şi 2) se poate constata că pentru fiecare drog studiat, numărul petelor, valoarea Rf şi culoarea sînt diferite de la o specie la alta.

Pe baza datelor din literatură (1)(16)(17)(19) şi analizei cromatografice a unor droguri cu antocianidine cunoscute, se pot identifica următoarele : delphinidina ($Rf = 0{,}33$), cianidina ($Rf = 0{,}55$), pelargonidina ($Rf = 0{,}85$), salvidina ($Rf = 0{,}80$), malvidina ($Rf = 0, 83$), petunidina ($Rf = 0{,}88$), paeonidina ($Rf = 0{,}70$). Deşi unele dintre ele prezintă o valoare *Rf* apropiată, ele se pot deosebi prin culoarea spoturilor : salvidina şi pelargonidina roşu-portocaliu, petunidina albastru-violet, cele din Papaver sp. şi Paeonia sp. roşu-brun, spre deosebire de celelalte care au o culoare roşu-violet.

Menţionăm faptul că valorile *Rf* ale pelargonidinei, petunidinei şi paeonidinei obţinute de noi sînt, proporţional, mai ridicate decît cele citate în literatură (1), diferenţe pe care le atribuim condiţiilor de lucru. De aceea recomandăm ca atunci cînd se analizează cromatografic antocianii, în lipsa substanţelor de referinţă, să se aplice în paralel probe de plante în care sînt cunoscuţi cu certitudine anumiţi antociani.

Cele mai multe tipuri de antocianidine am pus în evidenţă în florile de *Althaea rosea* şi în fructele de *Vaccinium myrtillus*, *Ribes nigrum*, *Cornus mas* şi *Parthenocissus quinquefolia* ce conţin cîte 4 antocianidine (fig. 1 şi 2).

Aplicînd pe cromatogramă aceeași cantitate de extract pentru fiecare drog, putem face și o determinare relativă a conținutului de antociani, în funcție de suprafața și intensitatea de colorație a petelor. În acest sens cele mai intense pete, deci și cu o valoare tinctorială mai mare, le

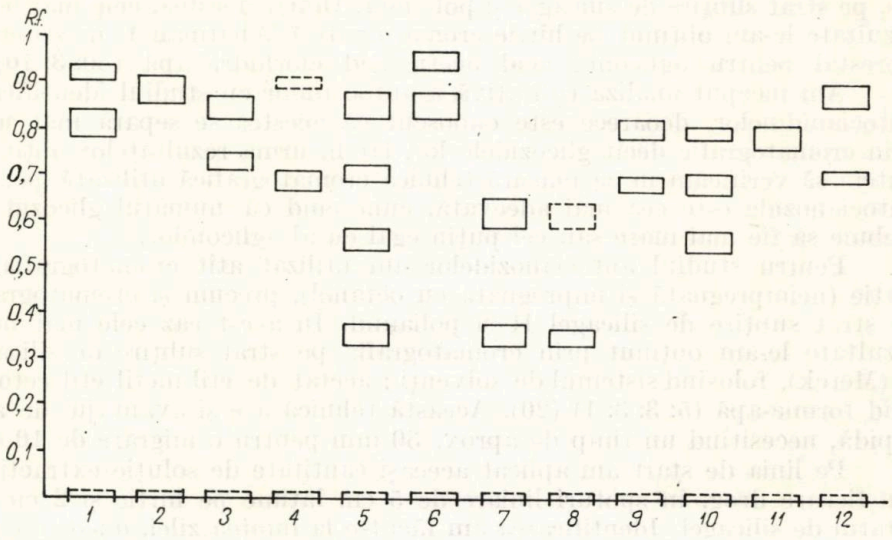


Fig. 1. — Cromatograma pe hîrtie a antocianidinelor din flori: *1.* — Salvia splendens; *2.* — Petunia hybrida; *3.* — Pelargonium zonale; *4.* — Centaurea cyanus; *5.* — Althaea rosea; *6.* — Malva neglecta; *7.* — Delphinium consolida; *8.* — D. orientale; *9.* — Paeonia off.; *10.* — P. tenuifolia; *11.* — Papaver rhöeas; *12.* — Rosa rugosa.

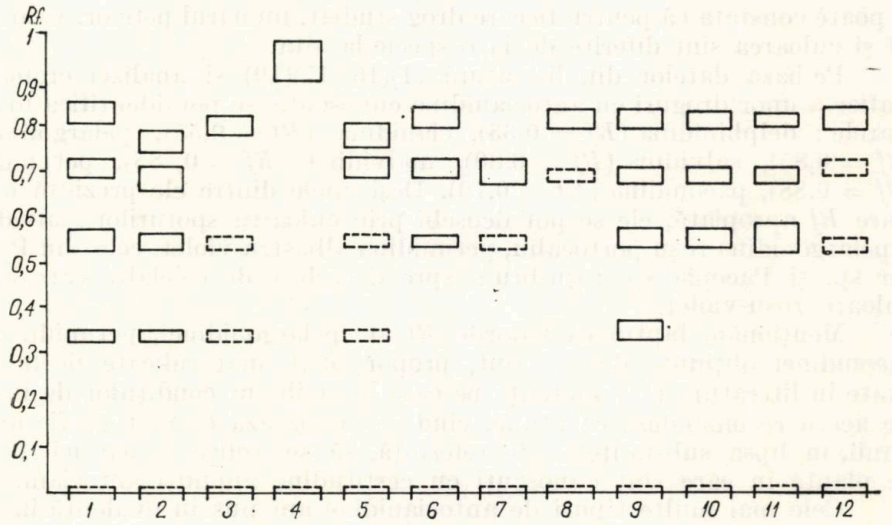


Fig. 2. — Cromatograma pe hîrtie a antocianidinelor din fructe. *1.* — Vaccinium myrtillus; *2.* — Ribes nigrum; *3.* — R. rubrum; *4.* — Ligustrum vulgare; *5.* — Cornus mas; *6.* — Rubus idaeus; *7.* — R. caesius; *8.* — Fragaria vesca; *9.* — Parthenocissus quinquefolia; *10.* — Sambucus nigra; *11.* — S. ebulus; *12.* — Vitis vinifera.

dau extractele din fructele de *V. myrtillus*, *R. nigrum*, *Ligustrum vulgare*, *Sambucus nigra*, *S. ebulus* şi *P. quinquefolia*.

În legătură cu natura antocianilor, în funcţie de înrudirea sistematică, putem face următoarele aprecieri: florile de *A. rosea* şi *Malva neglecta* se deosebesc profund între ele în privinţa antocianilor, dar între cele două specii de *Delphinium* nu există deosebiri în privinţa antocianidinelor. Între cele două specii de *Paeonia*, deosebirile se referă la numărul fracţiunilor antocianice separate. Antocianidinele din fructele de *R. nigrum* diferă şi calitativ şi cantitativ faţă de cele din *R. rubrum*. Fructele de *Rubus idaeus* conţin trei antocianidine pe cînd cele de *Rubus caesius* numai una. Fructele de *S. ebulus* se deosebesc de cele de *S. nigra*, prin cantitatea mai mare de cianidină pe care o conţin primele.

În cazul antocianidinelor din fructele de *Ligustrum* vulgare, am întîmpinat dificultăţi la separarea cromatografică, deoarece acestea migrează în frontul cromatogramei în toate sistemele de cromatografiere utilizate. Menţionăm că despre aceşti antociani nu avem nici o referire în literatură, cu toate că ei prezintă o valoare tinctorială mare.

Din analiza cromatogramelor pentru antocianozide (fig. 3 şi 4) obţinute pe strat subţire de silicagel H, deşi nu am identificat tipurile de glicozide pe care le conţine fiecare drog, totuşi, prin studiul comparativ, după numărul, culoarea şi valoarea *Rf* a petelor, se poate face cu uşurinţă o determinare rapidă şi precisă a provenienţei antocianilor. În cele mai multe cazuri am obţinut un număr de spoturi mai mare sau egal cu al antocianidinelor, ceea ce arată că tehnica folosită este adecvată pentru analiza calitativă a lor.

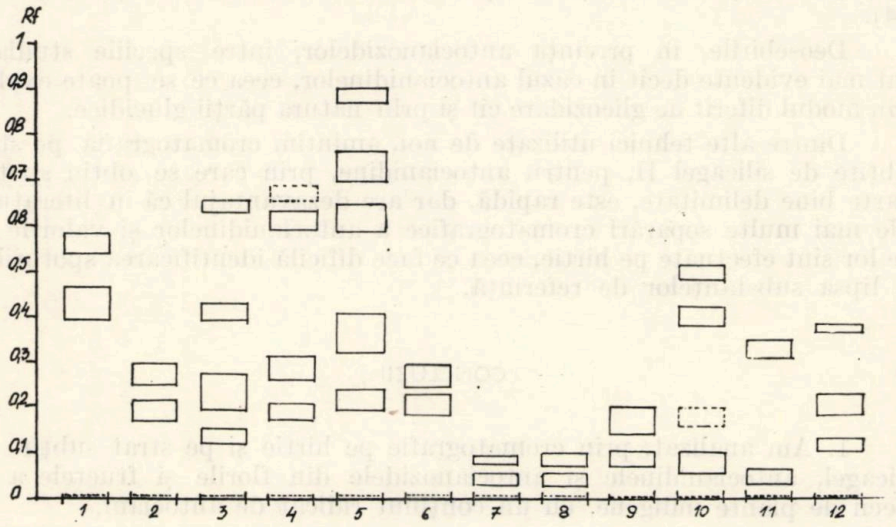


Fig. 3. — Cromatograma pe strat subţire de silicagel a antocianozidelor din flori. Numerotarea ca la fig. 1.

Faţă de numărul antocianozidelor citate în literatură pentru diferite specii, obţinute în cele mai multe cazuri prin cromatografie pe hîrtie, noi am obţinut, prin cromatografie pe strat subţire de silicagel H, un

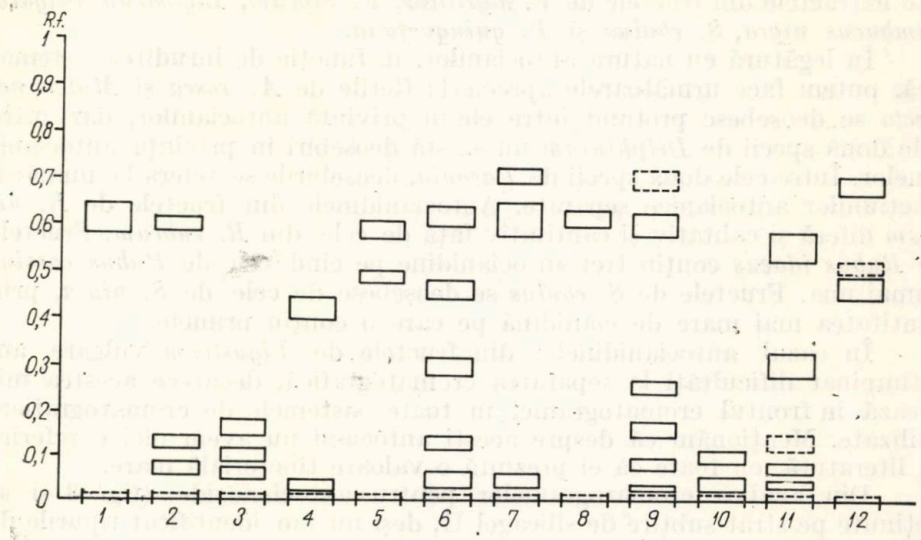


Fig. 4. — Cromatograma pe strat subțire a antocianozidelor din fructe. Numerotarea ca la fig. 2.

număr mai mare de spoturi (cu excepția fructelor de *V. myrtillus*), ceea ce relevă puterea de separare mai mare a silicagelului pentru antocianozide, dar totuși mai scăzută comparativ cu alte tehnici mai perfecționate (24).

Deosebirile, în privința antocianozidelor, între speciile studiate, sînt mai evidente decît în cazul antocianidinelor, ceea ce se poate explica prin modul diferit de glicozidare cît și prin natura părții glucidice.

Dintre alte tehnici utilizate de noi, amintim cromatografia pe strat subțire de silicagel H, pentru antocianidine, prin care se obțin spoturi foarte bine delimitate, este rapidă, dar are dezavantajul că în literatură, cele mai multe separări cromatografice a antocianidinelor și valorile *Rf* ale lor sînt efectuate pe hîrtie, ceea ce face dificilă identificarea spoturilor, în lipsa substanțelor de referință.

CONCLUZII

1. Am analizat, prin cromatografie pe hîrtie și pe strat subțire de silicagel, antocianidinele și antocianozidele din florile și fructele a 24 specii de plante indigene, cu un conținut ridicat de antociani.

2. Am indicat care este cea mai potrivită tehnică cromatografică pentru o bună separare a antocianidinelor și antocianozidelor.

3. Pentru fiecare drog am indicat numărul de fracțiuni separate, valoarea *Rf* și culoarea spoturilor și am identificat compuși de tipul delphinidinei, cianidinei, pelargonidinei, malvidinei, petunidinei și paeonidinei.

4. Metodele folosite şi rezultatele obţinute pot servi pentru o identificare rapidă şi precisă a provenienţei drogurilor cu antociani sau a coloranţilor naturali vegetali din diferite produse.

Prezentat la redacţie
la 15 ianuarie 1975

Disciplina de botanică farmaceutică
Facultatea de farmacie Cluj-Napoca

CHROMATOGRAPHIC IDENTIFICATION OF ANTHOCYANIDINS AND ANTHOCYANOSIDES IN SOME FLOWERS AND FRUITS OF INDIGENOUS PLANTS

SUMMARY

Chromatographic identification and separation of anthocyanidins and anthocyanosides of 24 indigenous plants (12 flowers and 12 fruits) were studied.

The most suitable methods for the chromatographic separation of these compounds are pointed out. For each drug, the number of spots, the *Rf* value and the colour of the spots are given, that is to recognize the character of the origin of anthocyanins from vegetable products.

BIBLIOGRAFIE

1. J. B. Harborne, *Comparative biochemistry of the flavonoids*, Acad. Press. London—New York, 1967, p.1.
2. C. Bodea, *Tratat de biochimie vegetală*, vol. II—Ed. Acad. R.S.R., Bucureşti, 1965, p. 871.
3. F. Blank, *Anthocyanins, flavones, xanthones* (în W. RUHLAND : Handbuch der Pflanzenphysiologie, Berlin—Heidelberg—Göttingen, Bd. X, 1958 p. 300).
4. T. Swain, *Comparative phytochemistry*, Acad. Press, London—New York, 1966, p. 271.
5. E. Constantinescu, I. Ciulei, Lia Sommer, Em. Grigorescu, Lucrările prezentate la Conferinţa Naţională de Farmacie, Bucureşti, 1958, p. 391.
6. R. Benigni, C. Capra, P. E. Cattorini, *Pianti medicinali*, vol. II, Inverni della Beffa, Milano, 1964, p. 951.
7. P. G. Seeger, Aerz. Forsch., **21**, 68 (1967).
8. Evd Coiciu, G. Racz, *Plante medicinale şi aromatice*, Ed. Acad. R.P.R., Bucureşti, 1962, p. 105, 183, 256, 305, 387, 442.
9. H. Pourrat, P. Tronche, A. Pourrat, Bull. Soc. Chim., **6**, 1918 (1966).
10. H. Pourrat, P. Bastide, P. Dorier, A. Pourrat, P. Tronche, Bull. Chim. Thera, **21**, 33 (1967).
11. I. Marinescu, *Adausuri în produse alimentare*, Ed. tehnică, Bucureşti, 1972.
12. A. Mehlitz, B. Matzik, Ind. Obst. Gemüserwert, **43**, 3 (1958).
13. J. B. Harborne, J. Chromatogr. **1**, 473 (1958).
14. T. G. Demina, Rastit. resursî, **4**, 88 (1968).
15. Srepel Branka, Farm. Glas, **22**, 493 (1966).
16. T. A. Geissman, *The chemistry of flavonoids compounds*, Pergamon Press, Oxford—London—New York—Paris, 1962, p. 53.
17. B. Voirin, These, Fac. Sci. Univ. Lyon, 1970.
18. M. Tămas, St. cerc. Biochim., **16**, 71 (1973).
19. F. J. Francis, J. B.Harborne, W. Barker, J. of Food Sci., **31**, 583, (1966).
20. E. Stahl, *Thin layer chromatography*, Springer Verl. Berlin—Heidelberg—New York, 1965, p. 376.
21. M. Lukner, *Prüfung von Drogen*, G. Fischer Verl. Jena, 1966 p. 133.
22. H. Suomalainen, A. J. A. Keränen, Nature, **191**, 498 (1961).
23. B. V. Chandler, K. A. Harper, Austral. J. Chem. **15**, 114 (1962).
24. M. Johnsson, E. Pettersson, Sci. Tools, **15**, 2, (1968).

ST. CERC. BIOCHIM., 19, 1, 121–123 (1976)

CAROTINOIDE DIN INSECTE. I*)

CAROTINOIDE DIN OUĂ, LARVE, ELITRE ŞI INSECTE ADULTE *CRIOCERIS DUODECEMPUNCTATA* L.

V. TĂMAŞ şi T. PERJU

Rezumat. — S-a stabilit conţinutul şi natura carotinoidelor din ouă, larve, elitre şi insecte adulte de *Crioceris duodecempunctata L.* S-a constatat o depozitare a carotinoidelor din planta cu care se hrănesc aceste insecte, precum şi o creştere a concentraţiei 5,6-epoxi-luteinei, ca urmare a catabolizării luteinei.

Primele cercetări asupra carotinoidelor din insecte au fost făcute de Zoph (1) şi Poulton (2), care au arătat că hemolimfa tuturor larvelor şi pupelor de lepidoptere conţin carotinoide în asociere cu proteine. Meyer (3) a fost primul care a identificat β-carotina în intestinul şi hemolimfa de *Pieris*, iar Goodwin (4) a identificat în aceste insecte, alături de β-carotină şi α-carotină, luteină şi 5,6-epoxi-luteină (5). Aceşti pigmenţi sînt luaţi prin peretele intestinal de către hemolimfă şi apoi transportaţi sub formă de carotino-proteide în întregul organism (6), (7). Astăzi sînt dovezi experimentale că acumularea carotinoidelor alimentare în corpul insectelor se realizează în trei moduri (4) : *a)* depozitarea fără deosebire a carotinoidelor dietare ; *b)* depozitarea preferenţială a uneia sau a două carotinoide ; *c)* degradarea carotinoidelor alimentare absorbite înainte de depozitare. Pentru insectele din ordinul *Lepidoptera* natura carotinoidelor prezente este o reflectare a celor din plantele cu care se hrănesc aceste insecte (8, 9, 10). Pe de altă parte, plantele de cartof nu conţin ceto-carotinoide, dar aceste carotinoide au fost identificate în gîndacul din Colorado (*Leptinotarsa decemlineata* Say), care se hrăneşte cu suc celular, respectiv ţesut vegetal din frunze de cartof (11).

Întrucît cercetările sistematice asupra carotinoidelor din insectele dăunătoare plantelor cultivate sînt destul de puţine, scopul acestei lucrări este de a stabili conţinutul şi natura carotinoidelor şi a derivaţilor lor din ouă, larve, elitre şi insecte adulte de *Crioceris duodecempunctata L.* care se hrănesc cu frunze, lăstari şi fructe de sparanghel *(Asparagus officinalis)*, precum şi de a găsi o corelaţie între carotinoidele din planta gazdă şi cele din insectă.

MATERIAL ŞI METODE

Insecte. Insectele adulte de *Criocerius duodecempunctata L.* (Crisomelidae Col.) sînt de culoare galbenă-portocalie, cu pete negre pe cap, torace şi elitre. Oul este alungit, de 1—0,4 mm de culoare galbenă-verzuie. Larva este de 7—8 mm lungime, de culoare roşcată-gălbuie.

*) Lucrarea face parte din Programul comun de cercetare al Institutului agronomic, Cluj-Napoca, România şi Univ. Rhode Island, Kingston, S.U.A.

Separarea și identificarea carotinoidelor. — *Extracția.* Carotinoidele au fost extrase în mod diferențiat, cu metanol și acetonă. Astfel, din ouă și larve, după o triturare prealabilă cu sticlă pisată, extracția s-a făcut de două ori cu metanol și apoi cu acetonă pînă la decolorare completă. Elitrele și insectele adulte au fost mojarate și apoi extrase cu metanol și acetonă. Extractele au fost evaporate la sec, iar rezidiile au fost saponificate cu KOH 10% metanolic. Durata saponificării a fost de 20 minute la extractele de ouă și din larve și de 2 ore la cele din elitre și din adulți, la temperatura de 50°.

Separarea cromatografică. Carotinoidele din extracte au fost separate prin cromatografie în strat subțire pe silicagel G. Irigarea s-a făcut cu un amestec de eter de petrol și benzen în proporție de 3 :1. Eluarea pigmenților s-a făcut cu eter etilic în cazul β-carotinei și a criptoxantinei, iar pentru luteină și zeaxantină cu eter etilic ce conținea 10% etanol (12).

Identificare. Determinările preliminare au fost făcute prin măsurarea spectrului de absorbție cu un spectrofotometru tip VSU-1 Zeiss și prin cocromatograme cu carotinoide autentice naturale.

Determinări cantitative. Toate determinările cantitative ale carotinoidelor au fost făcute spectrofotometric, utilizînd valorile relației $E^{1\%}_{1cm}$: β carotină : 2 505 (la 451 nm, în eter de petrol); criptoxantină : 2 460 (la 451 nm, în eter de petrol); luteină : 2 550 (la 447 nm, în etanol); 5,6-epoxi-luteină : 2 780 (la 453 nm, în benzen); zeaxantină : 2 350 (la 451 nm, în etanol) (8)—(12).

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Gîndacul *Crioceris duodecempunctata* al sparanghelului conține aceleași carotinoide ca și planta gazdă (tabela 1). Acest fapt denotă că insecta este capabilă doar de a depozita în diferite organe carotinoidele luate din plantă, fără a le putea metaboliza în cetocarotinoide, așa cum se petrece în cazul gîndacului din Colorado. Totuși, la gîndacul sparanghelului se constată o creștere însemnată a 5,6-epoxi-luteinei, ceea ce demonstrează că are loc un proces de catabolizare. Această carotinoidă provine în parte din cea absorbită din sucul și țesutul vegetal al plantei, iar în parte, foarte probabil, prin epoxidarea luteinei.

Tabela 1

Conținutul în carotinoide al ouălor, larvelor, elitrelor și insectelor adulte de *Crioceris duodecempunctata* L., precum și al frunzelor de sparanghel (mg/100 g material proaspăt)

Carotinoida	Ouă	Larve	Elitre	Insecte adulte	Frunze de sparanghel
β-Carotină	3,00	2,10	19,00	7,06	0,75
Criptoxantină	0,40	0,30	2,00	0,60	0,01
Luteină	1,05	0,15	4,00	2,50	0,15
5,6-Epoxi-luteină	0,01	0,08	0,70	0,20	urme
Zeaxantină	0,25	0,10	2,10	1,10	0,10
Total	4,71	3,00	27,80	11,46	1,01

Între concentrația 5,6-epoxi-luteinei și prolificitatea gîndacului sparanghelului ar putea fi o corelație. De altfel noi am observat o acumulare mai accentuată a 5,6-epoxi-luteinei în larve decît în adulți (tabela 1). Cantitatea cea mai mare de epoxi-luteină a fost găsită totdeauna în stadiul larvar al morfogenezei.

Este probabil că oxidarea luteinei, ca primă etapă în catabolizare, să continue la produși inferiori, ceea ce se va urmări în cercetări ulterioare, prin utilizarea de adausuri în alimentația insectelor cu carotinoide marcate cu ^{14}C.

Prezentat la redacție
la 14 noiembrie 1974

Institutul agronomic
Disciplina de biochimie medicală
Disciplina de entomologie agricolă
Cluj-Napoca.

CAROTENOIDS FROM EGGS, LARVAE, ELITRA AND BEETLES OF *CRIOCERIS DUODECEMPUNCTATA*

INSECT CAROTENOIDS. I

SUMMARY

Content and nature of carotenoids from eggs, larvae, elitra and beetles of *Crioceris duodecempunctata* were determined. There was established that these insects were living on a storage of dietary carotenoids of the plant and there was found out as well an increase of the 5,6-epoxy-lutein which is due to the lutein catabolism.

BIBLIOGRAFIE

1. W. Zoph, Bertr. Phys. Morph. Nied. Org., **3**, 26 (1883).
2. E. B. Poulton, Proc. R. Soc. (B), **38**, 269 (1885).
3. P. F. Meyer, Z. vergl. Physiol., **11**, 183 (1930).
4. T. W. Goodwin, *The Comparative Biochemistry of the Carotenoids*, Academic Press, London—New York, 1952, p. 248.
5. K. Egger, Planta, **80**, 65 (1968).
6. L. P. S. Van Der Geest, J. Insect Physiol., **14**, 537 (1969).
7. G. M. Chippendale și B. A. Kilby, J. Insect Physiol., **15**, 905 (1969).
8. J. S. E. Feltwell și L. R. G. Valadon, Nature, Lond., **225**, 969 (1970).
9. J. S. E. Feltwell și L. R. G. Valadon, J. Insect Physiol., **18**, 2203 (1972).
10. E. R. R. G. Valadon și R. S. Mummerg, Comp. Biochem. Physiol., **46 B**, 427 (1973).
11. F. Leuemberger, și H. Thommen, J. Insect Physiol., **16**, 1855 (1970).
12. V. Tămaș, Gh. Sălăjan și C. Bodea, St. cerc. biochim., **13**, 423 (1970).

ST. CERC. BIOCHIM., 19, 1, 125–127 (1976)

NOTĂ DE LABORATOR

CONTRIBUȚII LA DETERMINAREA CADMIULUI DIN URINĂ PRIN METODA SPECTROFOTOMETRICĂ DE ABSORBȚIE ATOMICĂ, CU ATOMIZARE ÎN CUPTOR DE GRAFIT

ÁGOTA KOVÁTS și B. BÖHM

Rezumat. — Se propune o metodă de dozare a cadmiului în urină, prin spectrofotometrie de absorbție atomică, cu cuptor de grafit. Proba de analizat este tratată mai întîi cu o soluție 2% a sării de amoniu a acidului pirolidinditiocarbonic și cu metil-izobutil cetonă, apoi se măsoară absorbția fazei organice injectate în cuptor. Se prezintă de asemenea valorile normale ale cadmiului în urină.

Toxicitatea mare a cadmiului, legătura dintre acumularea lui în organism și diferite îmbolnăviri (bronșita cronică, emfizem, hipertonie, cancer pulmonar, boli cardiovasculare), alcoolismul, fumatul, contacte profesionale (1), (2), impune găsirea unei metode de analiză rapide, sensibile, pentru determinarea cantităților în urme de cadmiu în diferite materiale, în special în material biologic.

Din cauza sensibilității inferioare, dificultăților, și duratei metodelor cu ditizonă (3), polarografice, spectrografice, invers voltametrice (4), a crescut interesul față de metode spectrofotometrice de absorbție atomică (SAA) pentru determinarea cadmiului.

S-au elaborat mai multe tehnici de SAA, cu sau fără flacără, avînd sensibilități diferite, după mineralizare prealabilă, sau metode extractive a diferiților complecși de cadmiu (ditizonă, sărurile acidului pirolidinditiocarbonic, dietilditiocarbamat, tri-n-octilamină, tri-izo-octilamină etc.) cu diferiți solvenți (cloroform, metil-izobutil-cetonă, nitrobenzen etc.) (5)—(12).

Avînd în vedere concentrația redusă de cadmiu în urina persoanelor „normale" (neexpuse), de circa 1 μg Cd/l (5), scopul nostru a fost găsirea unei metode sensibile, rapide, reproductibile, utilizînd cantități cît mai reduse de reactivi.

Principiul metodei:

Cadmiul complexat cu sarea de amoniu a acidului pirolidinditiocarbonic (PDTC-HN_4) este extras cu metilizobutilcetonă(MIBK) la pH=5—7. Atomizarea se realizează prin injectarea fazei organice în cuptor de grafit.

Aparatură:
- Spectrofotometru de absorbție atomică model Perkin-Elmer-300
- Atomizor HGA-72
- Pipete Eppendorf
- Eprubete de centrifugă tip Sovirel

Reactivi:
- soluție de PDTC-NH_4 2% în apă bidistilată
- metilizobutilcetonă (MIBK)
- soluție rezervă 1 mg Cd/ml în HNO_3 (d = 1,42) 1 :100 v/v
- soluție de lucru 2—10 μg Cd/l

Parametrii aparatului:
— Lungimea de undă: 229 nm
— Fantă: 7
— Curent de încălzire a lămpii de Cd: 8—9 mA
— Gaz protector: argon — debit 1,8 l/min
— Atenuarea înregistratorului: 1/10
— Viteza hîrtiei de înregistrare: 10 mm/min
— Programul de lucru a HGA-72

	Temp. °C	SK°	Timp—s
— Uscare	110	38	15
— Calcinare	350	86	30
— Atomizare	1600	332	15

Observaţie: nu este necesară folosirea compensatorului cu deuteriu.
Metoda de lucru:

Urina se colectează de preferinţă în vase de polietilenă sau în sticle spălate în prealabil cu acid azotic 4% şi de mai multe ori cu apă bidistilată (sau deionizată).

1. — 3 ml de urină se introduc în eprubete de centrifugă cu dop (tip Sovirel)
2. — se adaugă 0,2 ml soluţie PDTC-NH_4 2% şi 1 ml MIBK
3. — se agită timp de 1 minut cu agitator (250 agitaţii/minut) şi se centrifughează 10 minute la 3 000 turaţii/min pînă la separarea fazelor.
4. — se transferă o parte din stratul superior organic (MIBK) în vase de polietilenă sau sticlă, închise ermetic.
5. — se injectează în aparat 5 µl din faza organică

Paralel se efectuează probe oarbe cu reactivii şi probe etalon cu conţinut cunoscut de Cd.

Se recomandă determinarea periodică (după fiecare 15—20 probe) a absorbanţei probei etalon care va fi folosită în calcul.
Calcularea rezultatelor:

$$C_x = \frac{h_x - h_m}{h_e - h_m} \cdot C_e \ \mu g\ Cd/l$$

unde:
C_x = concentraţia probei — µg Cd/l
C_e — concentraţia etalonului — µg Cd/l
h_x = înălţimea semnalului probei — mm
h_e — înălţimea semnalului etalonului — mm
h_m = înălţimea semnalului martorului de reactivi.

Rezultate, concluzii:

S-au studiat condiţiile optime de calcinare şi de atomizare, găsind temperaturile optime de 350°C respectiv 1 600°C.

S-au stabilit pH-ul de lucru în domeniul pH = 5—7 — confirmîndu-se unele date din literatură — astfel nu este necesară adăugarea de soluţie tampon, avînd în vedere că urinile au pH = 5—7.

S-au construit curbe etalon — prin adăugare de cantităţi cunoscute de Cd la urină — şi s-a verificat domeniul de aplicabilitate (liniaritate) şi reproductibilitatea metodei. Astfel domeniul optim de lucru este de 0,01—0,1 ng Cd ceea ce în condiţiile de lucru descrise corespunde la urini cu concentraţie de 0,7—7 µg Cd/l.

La urinile cu concentraţie de cadmiu diferită de valorile sus menţionate, domeniul optim de lucru se respectă fie prin modificarea cantităţii injectate în aparat, fie prin modificarea raportului urină : MIBK la extracţie.

Urmărind recuperarea adaosului de cadmiu la urini în cantităţi de 1—6 μg/l la un număr de 20 de urini, am obţinut o recuperare între limitele 94—104%.

Concentraţiile „normale" de cadmiu în urină, determinate la 20 indivizi neexpuşi profesional la cadmiu, din spoturi unice, variază între limitele 0,27—2,78 μg Cd/l, media fiind 0,77 μd Cd/l.

În literatura de specialitate valoarea normală de cadmiu în urină de 24 ore este în medie : 1,7 μg Cd/l ; limite 0—4,1 μg Cd/l (5).

Metoda propusă s-a dovedit a fi o metodă sensibilă, reproductibilă şi de mare randament, a cărei utilizare permite analiza unei mare număr de probe.

Prezentat la redacţie
la 26 Septembrie 1974

Institutul de igienă şi sănătate publică
Laboratorul medicina muncii Cluj-Napoca

CONTRIBUTION TO THE URINARY CADMIUM DETERMINATION BY FLAMELESS ATOMIC ABSORPTION SPECTROPHOTOMETRY WITH ATOMIZATION IN GRAPHITE FURNACE

SUMMARY

A simple, sensitive method is proposed for the cadmium determination in the urine, by flameless atomic absorption spectrophotometry with graphite furnace.

The specimen is treated with a 2% solution of ammonium salt of pyrolidindithiocarbonique acid and with methyl-isobutylcetone. The absorbance of the organic phase introduced in the furnace is then determined.

The cadmium normal values in the urine are also presented.

BIBLIOGRAFIE

1. G. P. Lewis, W. I. Jusco,J. Chron. Diseases, Anglia, **25**, 717 (1972).
2. H. A. Schroder, Circulation 35, 570 (1967).
3. I. C. Smith, I. E. Kench, R. E. Lane, Biochem. J., **61**, 698 (1955).
4. M. Rosching, H. Matschiner, Chem. Anal. Warsawa, **16**, 725 (1971).
5. N. P. Kubasik, M. T. Volosin, Clin. Chemistry, **19**, 954 (1973).
6. H. T. Delves, G. Shepherd, P. Vitner, Analyst, **96**, 270 (1971).
7. N. Shiraishi, Japan Analyst, 21, 705 (1972).
8. Y. Yamamoto, T. Kumamaru, Y. Hayashi, M. Kannke, Japan Analyst, **20**, 347 (1971).
9. D. W. Yeager, J. Cholak, R. G. Meiners, Amer. Ind. Hyg. Assoc. J. **34**, 450 (1973
10. G. Buttgereit, Z. Anal. Chem., **267**, 81 (1973).
11. P. Schramel, Anal. Chim. Acta, **67**, 69 (1973).
12. Ph. D. Kaplan, M. Blakstone N. Richdale, Arch. Environ. Health **27**, 387 (1973).

„Studii și cercetări de biochimie" publică articole originale, de nivel științific superior, din toate domeniile biochimiei. Sumarele revistei sînt completate cu alte rubrici, ca : *Viața științifică*, în care prin note scurte sînt aduse la cunoștința cititorilor unele manifestări din domeniul biochimiei : congrese, simpozioane, consfătuiri, schimburi de experiență între cercetătorii români și cei străini etc., *Recenzii*, în care sînt prezentate cele mai recente lucrări de specialitate apărute în țară și peste hotare.

NOTĂ CĂTRE AUTORI

Autorii sînt rugați să înainteze articolele, notele și recenziile dactilografiate la două rînduri. Tabelele vor fi dactilografiate pe pagini separate, iar diagramele vor fi executate în tuș, pe hîrtie de calc. Tabelele și ilustrațiile vor fi numerotate cu cifre arabe. Figurile din planșe vor fi numerotate în continuarea celor din text. Se va evita repetarea acelorași date în text, tabele și grafice. Explicația figurilor va fi dactilografiată pe pagină separată. Citarea bibliografiei în text se va face în ordinea numerelor. Numerele autorilor va fi precedat de inițiale. Titlurile revistelor citate în bibliografie vor fi prescurtate conform uzanțelor internaționale.

Responsabilitatea asupra conținutului articolelor revine în exclusivitate autorilor.

Corespondența privind manuscrisele, schimbul de publicații etc., se va trimite pe adresa Comitetului de redacție : str. Docenților nr. 20, București 63, Sectorul 1.

1976 JUN 04

LUCRĂRI APĂRUTE ÎN EDITURA ACADEMIEI REPUBLICII SOCIALISTE ROMÂNIA

M. ŞERBAN şi D. COTARIU, **Biochimia contracţiei musculare**, 1940, 240 p., 20,50 lei.

L. DICULESCU, DOINA ONICESCU şi LETIŢIA MISCHIL, **Biologie celulară**, 1971, 420 p., 36 lei.

S. SĂLĂGEANU, **Fotosinteza**, 1972, 243 p., 5 pl., 13 lei.

V. D. MÎRZA şi H. ARAŢEI, **Biomorfologia corticalei ovariene la mamifere**, 1972, 180 p., 2 pl., 8 lei.

P. RAICU, M. IONESCU-VARO, G. GANCEVICI şi GABRIELA MOISESCU, **Celula. Structură, ultrastructură şi funcţii**, 1972, 344 p., 12 pl., 26 lei.

EUGEN MACOVSCHI, **Natura şi structura materiei vii**, 1972, 184 p., 4 pl., 15 lei.

I. V. DEACIUC, **Reglarea celulară a metabolismului glucozei şi acizilor graşi**, 1973, 255 p., 10,50 lei.

ST. CERC. BIOCHIM., TOMUL 19, NR. 1, P. 1–128, BUCUREŞTI, IANUARIE–IUNIE, 1976

c. 1052 – I. P. „Informaţia"

43 816

Lei 20. –

F-1330

66

studii şi cercetări de biochimie

2

TOMUL 19

1976

IULIE—DECEMBRIE

EDITURA ACADEMIEI REPUBLICII SOCIALISTE ROMÂNIA

St. cerc. biochim., tomul 19, nr. 2, p. 129—228, 1976, Bucureşti

SCBIAS — 19 (2), 129—228 (1976)

COMITETUL DE REDACŢIE

Redactor responsabil:

Academician E. MACOVSCHI

Redactor responsabil adjunct:

H. SLUŞANSCHI

Membri:

S. OERIU, membru corespondent al Academiei Republicii Socialiste România; EUGENIA SORU, membru corespondent al Academiei Republicii Socialiste România; M. MEZINCESCU; I. VASILESCU; TR. RĂDULESCU; VICTORIA ALEXANDRESCU

Secretar de redacţie:

CECILIA MOTAŞ

Revista apare de 2 ori pe an.

Preţul unui abonament anual este de 40 lei.

În ţară abonamentele se fac la oficiile poştale, agenţiile poştale, factorii poştali şi difuzorii voluntari din întreprinderi şi instituţii. Revista se poate procura (direct sau prin poştă) şi prin PUNCTUL DE DESFACERE din cadrul Editurii Academiei.

Cititorii din străinătate se pot abona adresîndu-se la ILEXIM. Departamentul Export-Import Presă, P.O.Box 136—137 telex: 11226, Bucureşti, str. 13 Decembrie nr. 3.

Manualele, cărţile şi revistele pentru schimb, precum şi orice corespondenţă, se vor trimite pe adresa Comitetului de redacţie al revistei „Studii şi cercetări de biochimie": Bucureşti, str. Docenţilor, nr. 20, sectorul 1. cod 71264.

EDITURA ACADEMIEI REPUBLICII SOCIALISTE ROMÂNIA
Bucureşti, Calea Victoriei nr. 125, sectorul 1. cod 71021

STUDII ŞI CERCETĂRI DE

B I O C H I M I E

Tomul 19, nr. 2 1976

IULIE—DECEMBRIE

ORSZÁGOS MÚSZAKI KÖNYVTÁR ÉS DOKUMENTÁCIÓS KÖZPONT

SUMAR

V. BOTA, IULIA KOVÁCS, Contribuţii la studiul polarografic al unor hormoni posthipofizari 131

LUCIA BUZILĂ, CORINA MIHAIL, CECILIA MOTAŞ, D. PĂLTINEANU, Proprietăţile lanţurilor H şi L ale imunoglobulinelor G de porc 137

ELENA ILIESCU, Oxidabilitatea la diferite potenţiale, în organele pomilor cu şi fără fructe 143

M.E. MACOVSCHI, OLGUŢA MACOVSCHI, Cercetarea biostructurii ţesutului muscular utilizînd metoda stoarcerii 151

OLGUŢA MACOVSCHI, Proteinele sarcoplasmatice acvosolubile în biostructura ţesutului muscular striat de iepure 155

OLGUŢA MACOVSCHI, Unele aspecte privind comportarea biostructurii ţesutului muscular striat în timpul păstrării la diferite temperaturi 165

LIDIA POPA, Acumularea aminoacizilor în mediul de cultură al unor bacterii 171

NATALIA S. ROŞOIU, Dinamica fracţiunilor lipidice la midie, în ciclul ei biologic anual 175

GH. SĂLĂJAN, V. TĂMAŞ, Îmbunătăţirea pigmentaţiei şi a valorii biologice a gălbenuşului de ou prin suplimentarea hranei găinilor cu făină de gogoşari roşii şi polen de porumb 183

LORA SCOLNIC, Efectul ionului fosfat şi al creatinei asupra nivelului fosfocreatinei din muşchiul gastrocnemian de broască 189

M. ŞERBAN, G. DĂNICEL, ALEXANDRA LOZINSCHI, GH. CÎMPEANU, Comportarea unor componente biochimice din serul sanguin provenit de la porci cu miopatie exsudativă 195

ADELA ŞTEFAN, ADRIANA VĂCARU, Modificări ale cantităţii de lipide şi fosfolipide la gărgăriţa sfeclei (*Bothynoderes punctiventris* Germ.) intoxicată cu HCH (hexaclorciclohexan) 199

V. TĂMAŞ, ANNEMARIE RAU-HUND, W. RAU, Efectul nicotinei asupra biosintezei carotinoidelor în *Fusarium aquaeductuum* 203

V. TĂMAŞ, V. CIURDARIU, T. PERJU, Carotinoide din insecte. II. Carotinoide din ouă, larve, elitre şi insecte de *Phytodecta fornicata* Brügg 209

REFERAT GENERAL

D. POPOV, Fosfataze. Rol metabolic şi mecanism de acţiune 215

RECENZII 225

STUDII ŞI CERCETĂRI DE

BIOCHIMIE

Tomul 19, nr. 2 1976

IULIE—DECEMBRIE

CONTENTS

V. BOTA, IULIA KOVÁCS, Contributions to the polarographic study of some retrohypophysial hormones 131

LUCIA BUZILĂ, CORINA MIHAIL, CECILIA MOTAS, D. PALTINEANU, The characteristics of H and L chains of porcine immunoglobin G 137

ELENA ILIESCU, Oxidability at different potentials, in the organs of trees bearing or not fruits 143

M.E. MACOVSCHI, OLGUŢA MACOVSCHI, Study on the biostructure of the muscle tissue by the sqeezing method 151

OLGUŢA MACOVSCHI, Sarcoplasmic aqueous soluble proteins in the biostructure of the striated rabbit muscle 155

OLGUŢA MACOVSCHI, Studies on the biostructure behaviour of the striated muscle during its storage at different temperatures 165

LIDIA POPA, Accumulation des amino-acides dans le milieu de culture de certains bactéries 171

NATALIA S. ROŞOIU, The dynamics of lipidic fractions from mussel, during its annual biological cycle 175

GH. SĂLĂJAN, V. TĂMAŞ, Improvement of the pigmentation and biological value of the egg yolk by supplementing the diet of laying hens with sweetbell redpepper meal and corn pollen 183

LORA SCOLNIC, The effect of phosphate ion and creatine on phospocreatine level from frog gastrocnemius muscle 189

M. ŞERBAN, G. DĂNICEL, ALEXANDRA LOZINSCHI, GH. CÎMPEANU, The behaviour of some biochemical components in the blood serum of pigs with exudative miopathy. 195

ADELA ŞTEFAN, ADRIANA VĂCARU, The modification of lipid and phospholipid content in the sugar beet weevil (*Bothynoderes punctiventris* Germ.) intoxicated with HCH (hexachlorocyclohexane) 199

V. TĂMAŞ, ANNEMARIE RAU-HUND, W. RAU, Effects of nicotine on biosynthesis of carotenoids by *Fusarium aquaeductuum* 203

V. TĂMAŞ, V. CIURDARU, T. PERJU, Insect carotenoids. II. Carotenoids from eggs, larvae, elitra and beetles of *Phytodecta fornicata* Brügg . . . 209

GENERAL REVIEW

DOINA POPOV, Phosphatases. Metabolic role and mechanism of action 215

REVIEWS 225

ST. CERC. BIOCHIM. 19, 2, 131–135 (1976)

CONTRIBUȚII LA STUDIUL POLAROGRAFIC AL UNOR HORMONI POSTHIPOFIZARI

VIRGIL BOTA, IULIA KOVÁCS

Rezumat. — A fost studiată comportarea polarografică în soluție de hexamină cobaltică a unor produse farmaceutice de ocitocină sintetică și a unui produs obținut din hipofiza posterioară.
Pe baza curbei de etalonare obținute cu un preparat sintetic cu activitate hormonală verificată prin metode biologice, s-a determinat concentrația unor soluții apoase de ocitocină sintetică în scopul evaluării activității preparatelor expirate.
În scopul caracterizării comportării polarografice a acesui hormon octapeptidic s-a examinat dependența de temperatură a curbei polarografice catalitice „duble" și s-a calculat coeficientul de temperatură și energia de activare a procesului de transport.
S-a cercetat și corelația existentă între înălțimea coloanei de mercur al E.P.M. și mărimea curentului limită, precum și variația potențialului de semiundă al Co^{III} în funcție de concentrația peptidei.

Pentru determinarea cantitativă a hormonilor posthipofizari se folosesc în special următoarele metode biologice: măsurarea tensiunii arteriale la cocoș, metoda glandei mamare, metoda organului izolat (1).

Unele metode biologice se caracterizează prin precizie, altele prin specificitate și sensibilitate. Toate necesită însă animale corespunzătoare, deseori greu de procurat, tehnici care reclamă un timp mai îndelungat de specializare. Din aceste motive ne-am propus să studiem determinarea polarografică a unor hormoni polipeptidici cum este ocitocina și condițiile corespunzătoare determinării polarografice a activității unor produse farmaceutice considerate valabile sau expirate.

Cu studiul polarografic al unor peptide din ser s-a ocupat Bridicka (2,3). El a observat în soluții amoniacale de Co^{III} formarea unor unde polarografice în prezența proteinelor. S-a tras concluzia că HS-proteinele sau -S-S-proteinele produc unda dublă observată, numită undă proteică.

Ocitocina și alți hormoni peptidici au fost studiați polarografic de către Hiroshi Sunahara, Derrel N. Ward și A. Clark Griffin (4,5). Cu determinarea ocitocinei și ocitocinazei din ser pe cale polarografică s-a ocupat M. Bartic și colab. (6). Deoarece undele polarografice ale ocitocinei în prezența ionilor de Co^{III} sînt superioare celor din soluțiile de Co^{II}, am studiat comportarea polarografică a unor produse de ocitocină sintetică și a unui preparat posthipofizar obținut din glande animale în soluții de hexamină cobaltică. Din înălțimea undelor catalitice obținute s-a determinat activitatea produselor farmaceutice studiate. S-a studiat și influența unor parametri ca concentrația peptidei, temperatura și presiunea electrodului picător de mercur asupra înălțimii undei polarografice.

MATERIAL ŞI METODĂ

S-au folosit pentru studiu preparatele hormonale sintetice de ocitocină „Richter", fiole de 1 ml conţinînd 3 U. I./ml, cu data de expirare 1 XII. 1974, ocitocina „Galenika", fiole de 1 ml conţinînd 5 U. I./ml, cu data de expirare V.1971, şi preparatul Retrohipofiza-Biofarm", flacoane a 1 g, cu activitate vasopresoare de 1000 U. I. /g.

Undele polarografice au fost înregistrate în soluţia de bază de: clorură hexaminocobaltică 1,1 mM, NH_4Cl 0,1 M, NH_3 0,1 M (pH = 9).

Pentru obţinerea curbei de etalonare s-a folosit preparatul sintetic de ocitocină „Richter", înregistrînd curbele polarografice în domeniul de concentraţii 0,2 — 2,5 μg/ml, la 25°C.

Curbele polarografice au fost înregistrate cu un polarograf Radelkis, tip OH, 102, la sensibilitatea de 2.10^{-7}, la o înălţime a coloanei de mercur de 47 cm.

Constanta capilarei 1,67 mg $2/3$ $s^{1/2}$

Dependenţa de temperatură s-a cercetat în intervalul de 288—313°K. Termostatarea s-a realizat cu o precizie de ±0,05°C.

Îndepărtarea oxigenului dizolvat în electrolit s-a asigurat prin barbotarea de metan purificat, timp de 15 minute înaintea începerii înregistrărilor.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Figura 1 reprezintă curba polarografică înregistrată cu o soluţie de bază conţinînd 1 μg/ml ocitocină „Richter".

Unda dublă proteică se caracterizează prin : $p_1 = -1{,}32$ V ; $p_2 = 1{,}42$ V şi $E_{1/2}$ global = — 1,30 V, iar unda Co^{III} are $E_{1/2} = 1{,}06$ V.

În privinţa originii acestor două unde Muller (8) a arătat că prima se datoreşte prezenţei fragmentului de asparagină din ocitocină, iar a II-a apare datorită prezenţei legăturii disulfidice. Hiroshi Sunahara şi colab.

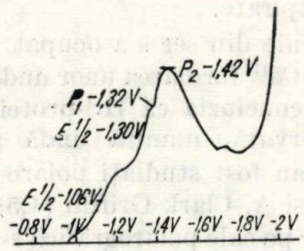


Fig. 1. — Curba polarografică a soluţiei de bază conţinînd 1 μg/ml ocitocină „Richter".

au dovedit experimental că înălţimea primei unde depinde în mod indirect de prezenţa undei a II-a fiind caracterizată printr-o scădere pronunţată în lipsa punţii disulfidice.

În scopul dozării ocitocinei se poate folosi înălţimea undei a II-a, care înglobează şi unda I, deoarece se caracterizează printr-un potenţial de semiundă bine definit.

În domeniul de concentraţii 0,2 — 2,5 μg/ml, studiat de noi, valorile curbei de etalonare prezintă o deviere de la liniaritate datorită fenomenului

de adsorbţie, fapt verificat prin concordanţa lor cu izoterma de adsorbţie de tip Langmuir (fig. 2). Dependenţa C/H în funcţie de C este liniară (fig.3) în conformitate cu ecuaţia lui Langmuir transformată

$$C/H = 1/W.Z + C/Z$$

(în care s-a presupus că numărului de molecule adsorbite N din ecuaţia originală îi corespunde înălţimea undei H). Din panta dreptei s-a obţinut

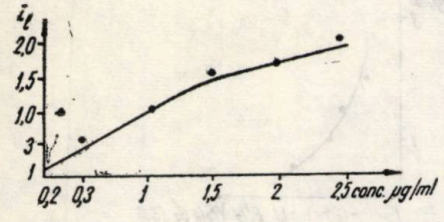


Fig. 2. — Variaţia curentului limită (i_l) în funcţie de concentraţia ocitocinei.

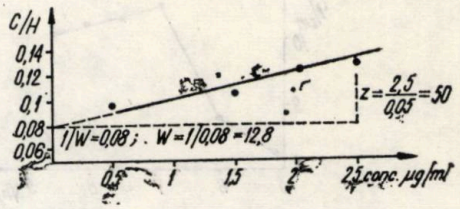


Fig. 3. — Variaţia C/H în funcţie de C(C = concentraţia ocitocinei, H = înălţimea undei polarografice).

valoarea 50 pentru Z, care este o constantă proporţională cu suprafaţa ocupată de moleculele adsorbite, iar valoarea lui $W = 12{,}5$, care este coeficientul de adsorbţie, a fost obţinută din intersecţia dreptei cu axa care reprezintă C/H.

Concentraţia a fost exprimată în μg/ml. Liniaritatea corelaţiei C/H — C s-a verificat şi prin calcul de corelaţie obţinîndu-se

$$r = -0{,}989 \text{ iar } S_0 = \pm 0{,}026.$$

Studiind dependenţa de temperatură a curbei catalitice de ocitocină în intervalul 288—313°K, s-a obţinut o corelaţie relativ aproximativ-liniară, caracterizată prin $r = -0{,}9055$ şi $S_0 = \pm 0{,}020$ şi un coeficient de temperatură

$$\alpha_T = +2{,}72\ \%\ /°\text{K}.$$

Din datele acestei dependenţe de temperatură s-a calculat valoarea energiei de activare a procesului de transport

$$E^x = 9{,}27 \pm 0{,}76 \text{ kcal/mol}.$$

Studiul dependenţei curentului limită de înălţimea coloanei de Hg a arătat că în domeniul de 26—65 cm are loc la început o creştere a curentului limită în funcţie de $\sqrt{h_{Hg}}$, iar după aceea o uşoară scădere, fapt semnalat şi de Sunahara şi colab. (5), care interpretează acest fenomen ca o mărire a adsorbţiei (fig. 4) ocitocinei pe suprafaţa crescută a electrodului picător de mercur.

În figura 5 este arătată dependenţa potenţialului de semiundă al Co^{III} în funcţie de concentraţia peptidică. Comparînd datele hiperbolei noastre obţinute prin reprezentarea dependenţei amintite, cu cele obţinute

de Sunahara pentru vasopresină, se poate constata că ocitocina formează un complex mai stabil cu ionii Co^{III} (fig. 5).

Pe baza curbei de etalonare s-a verificat stabilitatea unui produs sintetic de ocitocină „Galenika" avînd termenul de expiraţie V. 1971. Rezultatul obţinut arată că concentraţia în substanţă activă s-a redus după 31 de luni la jumătate.

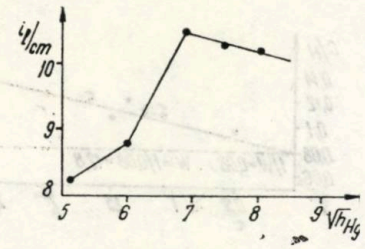


Fig. 4. — Dependenţa curentului limită de înălţimea coloanei de Hg.

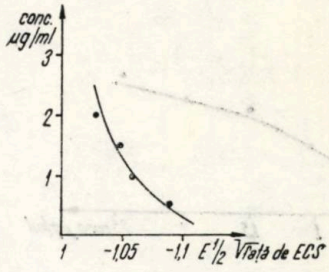


Fig. 5. — Dependenţa potenţialului de semiundă a Co^{III} în funcţie de concentraţia peptidică.

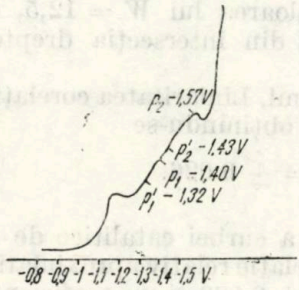


Fig. 6. — Curba polarografică a preparatului „Retrohipofiză Biofarm"

Studiul polarografic al preparatului „Retrohipofiză Biofarm" executat în soluţie cu concentraţia de 10 µg/ml la pH = 9 a reuşit ca pe lîngă curba polarografică caracteristică vasopresinei cu p_1=1,40 V şi p_2=—1,57 V să pună în evidenţă şi curba polarografică caracteristică ocitocinei, caracterizată prin $E_{1/2}$ = — 1,32 V. (fig. 6).

Pe baza înălţimii acestei unde, folosind curba noastră de etalonare s-a putut determina cantitatea ocitocinei din produsul farmaceutic ca fiind egală cu 4%.

CONCLUZII

Preparatele sintetice de ocitocină prezintă în soluţie de hexamină cobaltică o undă polarografică dublă. În scopul determinării activităţii ocitocinei din soluţii apoase se poate folosi înălţimea undei a II-a caracterizată printr-un potenţial de semiundă bine definit.

Ocitocina formează cu Co^{III} un complex mai stabil decît vasopresina. Pe baza curbelor polarografice caracteristice se poate determina cantitatea de ocitocină prezentă în soluție alături de vasopresină.

Prezentat la redacție la 5 februarie 1975

Institutul de Medicină și Farmacie Tîrgu Mureș
Facultatea de Farmacie
Disciplina de biochimie și chimie sanitară

CONTRIBUTIONS TO THE POLAROGRAPHIC STUDY OF SOME RETROHYPOPHYSIAL HORMONES

SUMMARY

The polarographic behaviour of some pharmaceutical products of synthetic oxytocin and a product obtained from the posterior pituitary gland in cobaltic ammonia-ammonium chloride solutions has been studied.

Examining the calibration curve obtained with a synthetical product whose hormonal activity was verified through biological methods, we have established the concentration of aqueous solutions of synthetic oxytocin, in order to evaluate the activity of the expired products.

Studies were carried out to determine the dependence of the double catalytic polarographic wave on temperature. We have calculated the temperature coefficient and the activation energy of the transport process. The relationship of the wave height to pressure on the dropping mercury electrode and the effect of peptide concentration on the Co^{III} half-wave potential were studied.

BIBLIOGRAFIE

1. B. Berde, *Assay of Protein and Polypeptide Hormone.* Pergamon Press, Oxford, **33**, 1970, p. 129.
2. R. Bridicka, Collection Czechoslov. Chem. Commun., **5**, 112 (1937), ibid **5**, 148 (1937).
3. R. Bridicka, Nature **139**, 330, 1070 (1973).
4. Hiroshi Sunahara et. al., J. Amer. Chem. Soc. **82**, 6017 (1960).
5. Hiroshi Sunahara et. al., J. Amer. Chem. Soc. **82**, 6023 (1960).
6. M. Bartic, Cs. Gynecologie **32**, 1,64 (1967).

ST. CERC. BIOCHIM., 19, 2, 137–142 (1976)

PROPRIETĂȚILE LANȚURILOR H ȘI L ALE IMUNOGLOBULINELOR G DE PORC

LUCIA BUZILĂ, CORINA MIHAIL, CECILIA MOTAȘ, D. PĂLTINEANU*

Rezumat. — S-au studiat lanțurile H și L provenite de la imunoglobulinele de purcei de 21 de zile, de la două grupuri : I. — animale individuale și II. — loturi de cîte patru animale, din diferite ferme, comparativ cu animale martor crescute la o fermă experimentală. S-au efectuat imunoelectroforeza, dubla difuzie, electroforeza în gel de poliacrilamidă cu uree, la pH alcalin și cromatografia în strat subțire. Raportul H/L a fost totdeauna mai mic la animalele din diferite ferme față de cele considerate ca martor; la animalele din diferite ferme s-au obținut lanțuri L cu viteze de migrare diferite și care prezintă la electroforeza în gel de poliacrilamidă un număr mai redus de benzi. Unele preparate conțin și lanțuri H cu viteze de migrare deosebite care se pot datora fie grupării lor glucidice diferite, fie dimerizării. Se ajunge la concluzia că imunoglobulinele G ale animalelor din diferite ferme prezintă unele modificări ale proprietăților lanțurilor H și L.

Sistemul de apărare imun al porcilor a fost mult studiat datorită lipsei transferului placentar a anticorpilor la aceste animale. Protecția imunologică a purceilor din primele zile de la naștere este conferită aproape în exclusivitate de către anticorpii absorbiți din colostru (1). S-a studiat astfel, producerea anticorpilor specifici la purcei fără caracterizarea imunoglobulinelor implicate în acest proces (2) (3). Tipurile de imunoglobulină prezente în serul și colostrul porcilor s-au stabilit prin analogie cu tipurile de la om (4).

Mai recent, Porter (4) și Bourne (6) au încercat să determine, prin reacții imune specifice, cantitățile corespunzătoare tipurilor de imunoglobuline prezente în diferite etape de creștere la purcei, comparativ cu cantitățile prezente la porcul adult sau la scroafă.

Caracterizarea fizico-chimică, biochimică și imunochimică a imunoglobulinelor de porc, asemănătoare cu cea a imunoglobulinelor de om sau iepure, s-a făcut în mod sporadic.

S-a constatat astfel că în timpul procesului de purificare apar două tipuri de imunoglobuline G, G_1 și G_2 (6) (7), iar prin reacții imune s-au evidențiat și fracțiunile G_3 și G_4 (8).

Ne-am propus să luăm în studiu imunoglobulinele G atît de la animale individuale cît și de la loturi de purcei de 21 de zile, comparativ cu un martor. Arbitrar s-au folosit notațiile : P și C pentru animalele din grupul I și respectiv Cr. Mo și T. S. pentru animalele din grupul II.

MATERIAL ȘI METODE

S-a lucrat pe două grupuri de purcei de 21 de zile : grupul I, format din animale individuale din diferite ferme și grupul II, format din loturi de cîte patru animale, din diferite ferme. Ambele grupe au avut ca martor, animale de aceeași vîrstă crescute la o fermă experimentală.

Purificarea imunoglobulinelor G din serul sanguin de porc s-a făcut prin precipitare cu sulfat de amoniu 33%. Precipitatul dializat faţă de tampon fosfat 0,04M, pH = 6,5 a fost cromatografiat pe o coloană de DEAE-Sephadex, echilibrată în acelaşi tampon. (Pentru 30 ml ser sanguin s-a folosit o coloană de 60 × 2,4 cm). Nu am obţinut niciodată o cantitate de 2 g/100 ml ser semnalată de Bourne (9).

Reducerea imunoglobulinelor s-a făcut după metoda lui Fleischman (10), utilizînd o soluţie de imunoglobulină G 2% în tampon TRIS 0,55 M, pH = 8,2, în care s-a adăugat beta-mercaptoetanol pentru a ajunge la o molaritate de 0,55. Amestecul s-a ţinut 1 oră la temperatura camerei, după care s-a adăugat un volum egal de iodacetamidă 0,5 M, în acelaşi tampon în care s-a dizolvat imunoglobulina. S-a păstrat 1 oră la 0°C. S-a dializat cu agitare constantă faţă de 100 ml apă rece pentru îndepărtarea excesului de iodacetamidă şi apoi pe acid acetic N, timp de 16—20 ore. După dializă, preparatul a fost cromatografiat pentru separarea lanţurilor pe o coloană de Sephadex G-100 eluată cu acid acetic N (dimensiune 90 × 1 cm). Lanţurile grele şi uşoare au fost concentrate şi dializate pe apă distilată.

Analiza imunoelectroforetică s-a făcut în gel de agaroză 1% în tampon veronal-veronal sodic, pH = 8,0, μ = 0,05. Evidenţierea liniilor s-a făcut cu un ser de iepure anti imunoglobulină G de porc.

Dubla difuzie s-a făcut folosind un gel de agaroză 1% în ser fiziologic.

Electroforeza în disc în gel de poliacrilamidă la pH alcalin s-a făcut după Reisfeld (11).

Cromatografia în strat subţire s-a făcut pe Sephadex G-200 superfin (12) în tampon fosfat 0,02M, pH = 7,0 ce conţinea NaCl 0,2M. Grosimea gelului obţinut (după un timp de îmbibare de 72 ore) prin întinderea pe plăci de sticlă (20 × 15 cm) cu ajutorul unui stratificator special a fost de 0,5 mm; înclinaţia plăcii faţă de cuvă a fost de 20°. Timp de migrare 4 ore, după care placa se acoperă cu hîrtie de filtru Whatman nr. 3. După uscare la 90—100°C timp de 30 minute şi răcire la temperatura camerei, se colorează cu albastru de bromfenol timp de 1 oră şi se spală apoi cu o soluţie de acid acetic 3%. În timpul spălării, hîrtia de filtru se desprinde de pe gel; după uscarea hîrtiei se fac determinările de greutate moleculară şi interpretarea datelor.

REZULTATE

Reducerea imunoglobulinelor. Curbele cromatografice de la reducerea imunoglobulinei G prezintă trei piscuri: primul, mai mic, este imunoglobulina neredusă, al doilea, lanţul greu, iar al treilea, lanţul uşor (fig. 1). Aspectul curbelor a fost similar la serul ambelor grupe de animale.

Randamentul reducerii imunoglobulinelor G este redat în tabela 1.

Se observă că randamentul este mai bun la grupul animalelor individuale deoarece procentul de imunoglobulină G neredusă este mai mic. Acest fapt poate fi datorat calităţii reducătorului întrebuinţat (β-mercaptoetanol), cele două grupe fiind lucrate separat.

În ceea ce priveşte raportul H/L, se observă a fi mai mare la martor în cazul ambelor grupe.

Analiza imunoelectroforetică a imunoglobulinelor G faţă de un antiser anti imunoglobulină G este redată în figura 2 (*a* şi *b*).

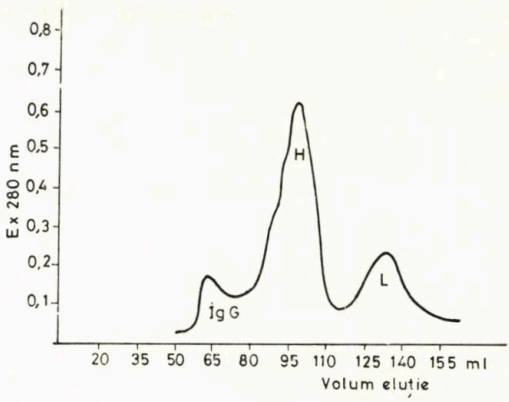
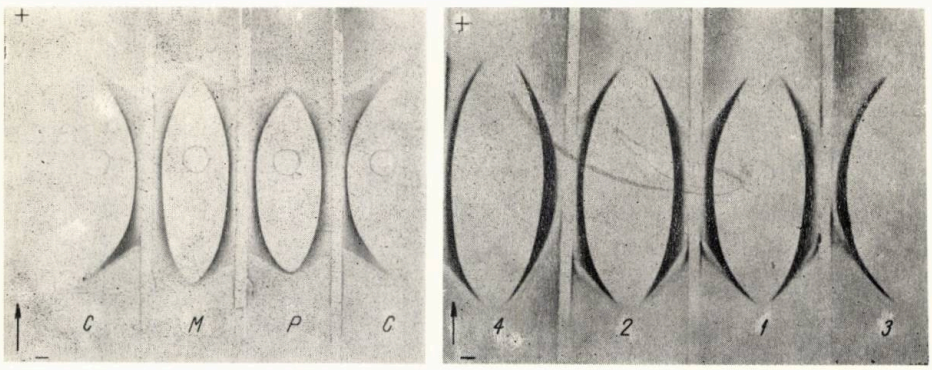


Fig. 1. — Separarea lanțurilor ușoare și grele pe Sephadex G-100 după reducerea imunoglobulinei G.

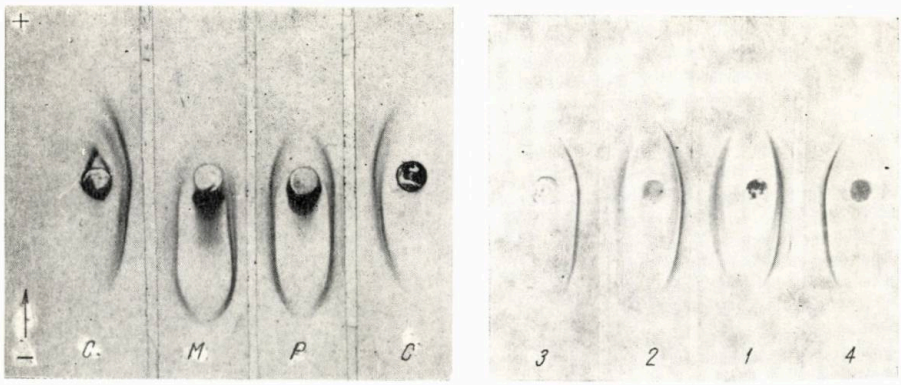


a *b*

Fig. 2. — Analiza imunoelectroforetică a imunoglobulinei G cu un ser imun anti imunoglobulină G.

a) Martor
P
C

b) 1 = Cr
2 = Mo
3 = T.S.
4 = Martor

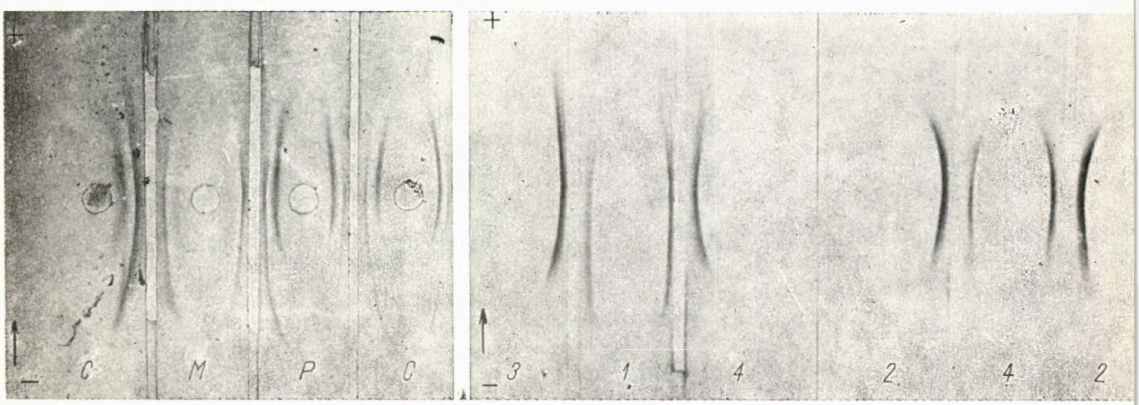


a *b*

Fig. 3. — Analiza imunoelectroforetică a lanțurilor grele (H) cu un ser imun anti imunoglobulină G.

a) Martor
P
C

b) 1 = Cr
2 = Mo
3 = T.S.
4 = Martor

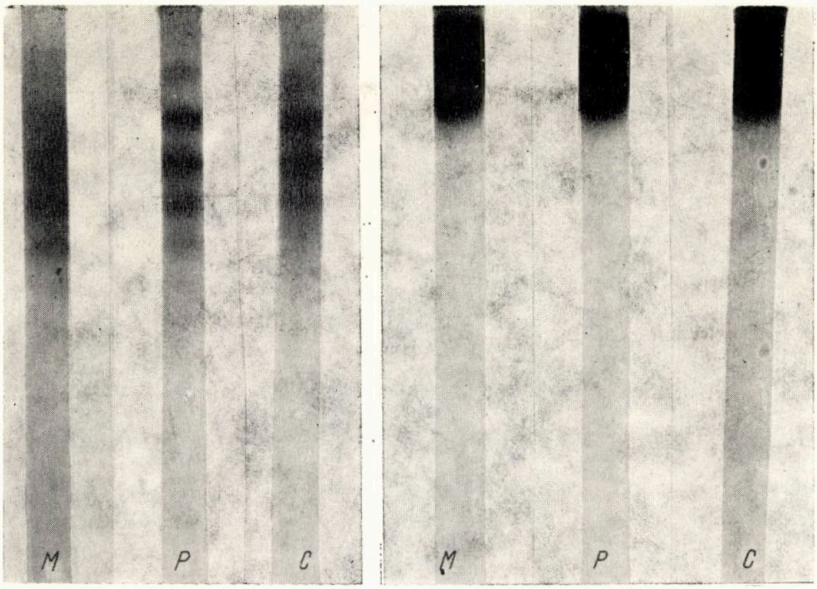


a *b*

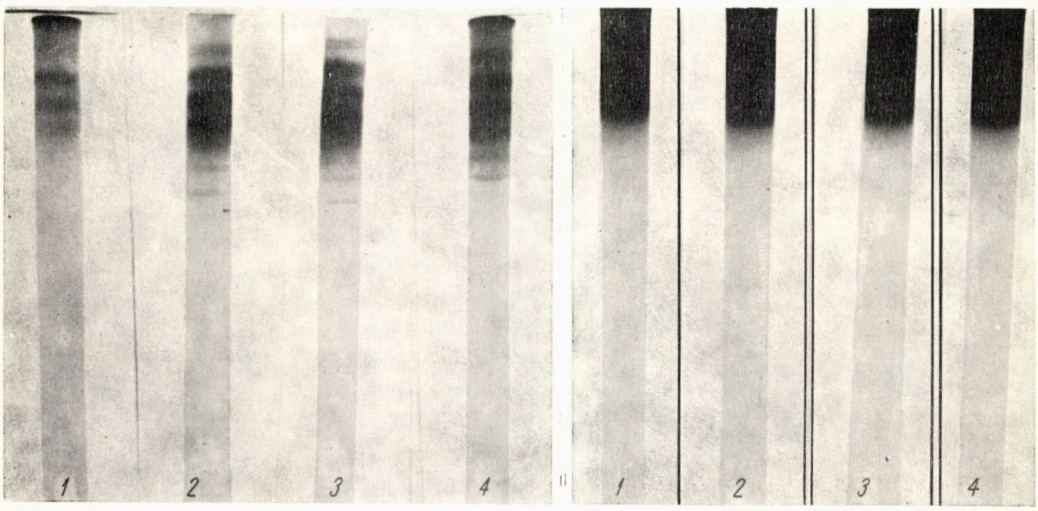
Fig. 4. — Analiza imunoelectroforetică a lanțurilor ușoare (L) cu un ser imun anti imunoglobulină G.

a) Martor
P
C

b) 1 = Cr
2 = Mo
3 = T.S.
4 = martor



a



b

Fig. 5. — Electroforeza în disc pe gel de poliacrilamidă la pH alcalin cu uree a lanțurilor grele și ușoare.

a) Martor *b*) 1 = Cr
P 2 = Mo
C 3 = T.S
4 = Martor

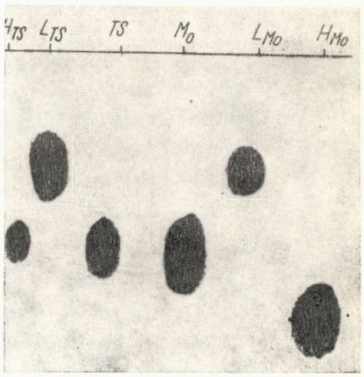


Fig. 6. — Cromatografia în strat subțire a imunoglobulinei G și respectiv a lanțurilor grele și ușoare de la preparatul Mo, comparativ cu preparatul T.S.

$H_{T.S_o}$ = lanț greu T.S. H_{Mo} = lanț greu Mo
$L_{T.S.}$ = lanț ușor T.S. L_{Mo} = lanț ușor Mo
T.S. = imunoglob. G neredusă Mo = imunoglob. G neredusă

Tabela 1

Grupul	Serul	% Imuno-glob. G neredusă	% H	% L	H/L
I animale individuale	Martor	4,43	79,55	16,02	4,96
	P	5,34	72,51	22,15	3,27
	C	—	78,82	21,18	3,72
II loturi de cîte 4 animale	Martor	9,27	68,70	22,03	3,11
	T.S.	7,45	67,31	25,24	2,66
	Mo.	7,70	66,87	25,43	2,62
	Cr.	10,35	63,94	25,71	2,48

Atît la grupul I cît și la grupul II, vitezele de migrare ale imunoglobulinelor nu prezintă nici un fel de deosebiri (fig. 2*a* și 2*b*).

Analiza imunoelectroforetică a lanțurilor grele este arătată în figura 3*a* și 3*b*.

La grupul I se evidențiază o viteză de migrare crescută a lanțurilor grele în cazul preparatului C. Martorul are cea mai lentă viteză de migrare (fig. 3 *a*). La grupul II nu se observă nici un fel de diferențe din punct de vedere al migrării electroforetice sau a arcurilor de precipitare între martor și animalele din diferite ferme (fig. 3*b*).

Analiza imunoelectroforetică a lanțurilor ușoare (figura 4*a* și 4*b*) evidențiază la preparatele C și P din grupa I prezența a două linii de precipitare cu serul anti imunoglobulină G. Martorul prezintă o singură linie de precipitare cu migrare catodică. Linia intensă cu migrare anodică, prezentă doar la preparatele C și P poate prezenta lanțuri ușoare monomere, pentru ca linia catodică, comună tuturor probelor să reprezinte lanțuri ușoare dimerizate. Nici una din liniile de precipitare nu poate reprezenta impuritate de imunoglobulină G sau de lanț H deoarece prezintă o migrare deosebită de a acestora (fig. 4*a*). Lanțurile ușoare ale preparatelor din grupul II dau cîte o singură linie de precipitare și diferențe vizibile de migrare la porcii Cr. Arcul de precipitare format prezintă o alungire foarte pronunțată spre catod. Comparativ cu preparatele din grupul I, preparatele din grupul II ar prezenta lanțuri ușoare monomere, cu excepția preparatului Cr care ar avea lanțuri ușoare dimerizate (fig. 4*b*).

Probele de dublă difuzie demonstrează la grupul I o identitate totală a lanțurilor H. Identitate totală este prezentă și între lanțurile ușoare, demonstrînd preparatele de lanț, fără impurificare cu imunoglobulină G sau lanț greu cum ar sugera prezența celor două arcuri de precipitare de la imunoelectroforeză. Se confirmă astfel presupunerea existenței de lanțuri ușoare monomere și dimere în același preparat. La grupul II se observă identitate totală atît între lanțurile H cît și între lanțurile L. Se demonstrează astfel că lanțul L al preparatului Cr reprezintă în adevăr lanțuri ușoare dimerizate.

Electroforeza în disc pe gel de poliacrilamidă (figura 5*a* și 5*b*) evidențiază bandarea lanțurilor L foarte asemănătoare la toate cele trei probe ale grupului I (fig. 5*a*) ca și comportarea electroforetică asemănătoare la toate cele trei probe de lanț H. La grupul II rezultatele pot fi corelate cu

cele de la imunoelectroforeză. Spectrul electroforetic al lanţurilor L din preparatul Cr este mai sărac (prezintă 3—4 fracţiuni) faţă de al lanţurilor L din celelalte preparate a căror spectru electroforetic prezintă 6—7 fracţiuni (fig. 5*b*). În ceea ce priveşte lanţurile grele, nu se obţin nici un fel de deosebiri între preparatele grupului II.

Cromatografia în strat subţire (fig. 6) s-a efectuat numai pentru preparatele din grupul II. S-au analizat imunoglobulina G şi lanţurile grele şi uşoare obţinute prin reducerea imunoglobulinei G. Nu s-au obţinut diferenţe decît în cadrul lanţurilor H şi anume, lanţul H de la preparatul Mo. prezintă o greutate moleculară mult mai mare decît a celorlalte lanţuri H şi chiar mai mare decît cea a imunoglobulinei G din care a provenit.

DISCUŢII

După reducerea imunoglobulinelor în lanţuri se observă o cantitate crescută de lanţ L la porcii din diferite ferme în jur de 25% faţă de cea de la lotul martor (22%) (tabela 1). Aceeaşi tendinţă a fost observată şi pe cîte un singur animal, 21—22% lanţ L la cei din diferite ferme faţă de 16% la martori.

Deosebirile în migrarea electroforetică a lanţurilor L prin prezenţa a două linii de precipitare cu viteze deosebite, cu serul antiimunoglobulină G la animalele din complexe faţă de martori, a căror lanţuri L dădeau o singură linie de precipitare (fig. 4*a*) ar putea fi corelate cu diferenţa între punctele izoelectrice ale celor două tipuri de lanţuri uşoare (K şi λ) semnalată la om (13). Dealtfel, tot două linii de precipitare obţin pentru lanţurile uşoare din imunoglobulina G de porc cu ser anti imunoglobulină G şi Metzger şi Fougereau (14) care le atribuie fie dimerizării, fie existenţei a două tipuri antigenice.

Diferenţele de migrare electroforetică a lanţurilor uşoare la preparatul Cr din grupul II, cu o încetinire a vitezei de migrare (fig. 4*b*), amintesc de viteza mai lentă de migrare a lanţurilor λ la om, observată însă numai în disc-electroforeză cu sodiu dodecilsulfat (15). În cazul porcilor, diferenţele nu se pot datora greutăţii moleculare ceva mai mari a lanţurilor λ ca la om, deoarece, chiar dacă ea este reală nu poate fi sesizată prin imunoelectroforeză în agaroză. Nu este exclus însă, ca la lotul Cr să predomine lanţuri L de tip λ.

Cum lanţurile uşoare sînt glicoproteine, diferenţele de migrare se pot datora şi conţinutului lor diferit în glucide. Abel (16) a comparat conţinutul în hexoze a lanţurilor K şi λ de la om şi a găsit o cantitate mai mică pe lanţurile λ. Deoarece nu este dată şi compoziţia în acid neuraminic, nu se poate stabili încă nici o corelaţie între conţinutul glucidic şi viteza de migrare electroforetică.

Deosebirea observată la viteza de migrare electroforetică a lanţurilor L este confirmată şi de electroforeza în disc, prin numărul redus de benzi obţinut la acelaşi lot Cr (fig. 5*b*).

În ceea ce priveşte lanţurile H, s-au obţinut la grupul I viteze de migrare electroforetică diferite la preparatul C, cea mai mare, faţă de cea a animalelor martor care era cea mai lentă (fig. 3 *a*). Aceste diferenţe în vitezele de migrare a lanţurilor H se pot datora eterogenităţii părţilor glucidice care prin cantităţi diferite de acid neuraminic pot prezenta migrări

deosebite. Diferențele se pot datora însă și faptului că probele de imunoglobulină G provin de la animale individuale.

Practicarea cromatografiei în strat subțire a condus la relevarea unor lanțuri H cu greutatea moleculară mult crescută în cadrul grupului II (fig. 6). Acestea ar putea rezulta dintr-un proces de dimerizare, mai ales că preparatul de imunoglobulină G din care provine nu prezintă o viteză de migrare deosebită (fig. 6 și fig. 2*b*).

În concluzie se pot spune că la animalele din diferite ferme există o tendință spre prezența unor imunoglobuline G mai deosebite, mai labile, care dau prin reducere o cantitate mărită de lanțuri L. Lanțurile lor H și mai ales L prezintă unele modificări ale proprietăților lor (viteză de migrare, proces de dimerizare, bandare în poliacrilamidă etc.), care par să caracterizeze aceste imunoglobuline.

Prezentat la redacție la 14 VII 1976,

Institutul de științe biologice, București,
Splaiul Independenței nr. 296 și
**Institutul de cercetări veterinare și biopreparate*
Pasteur, București, Șos. Giulești nr. 333

THE CHARACTERISTICS OF H AND L CHAINS OF PORCINE IMMUNOGLOBULIN G

SUMMARY

The heavy and light chains of immunoglobulin G were studied proceeding from piglets of 21 days old of two groups of animals: group I — single animals and group II — a series of four animals from different stock farms as compared with experimental farm breeded animals as control.

Immunoelectrophoresis, double diffusion, disc electrophoresis in polyacrylamide with urea in alkaline pH, and thin layer chromatography were carried out.

The H/L ratio was always smaller in animals from different stock farms as compared with that of controls.

Polyacrylamide electrophoresis of the group II sera revealed light chains with various migration rate, with a reduced number of precipitin arcs. Some preparations contained also heavy chains with various migration rates owing either to their different glucidic groups or to dimerisation.

We can submit that the immunoglobulin G of animals from different stock farms presented some modifications of the characteristics of H and L chains.

BIBLIOGRAFIE

1. J. Sterzl, J. Rejcrek, J. Travnicek, Folia Microbiol., *11*, 7 (1966).
2. J. Sterzl, J. Kostka, I. Riha, L. Mandei, Folia Microbiol., *5*, 29 (1960).
3. V. C. Speer, H. Brown, L. Quinn, D. V. Catron, J. Immunol., *83*, 632 (1959).
4. B. W. Karlson, Acta pathol. Microbiol. Scand., *67*, 237 (1966).
5. P. Porter, Biochim. Biophys. Acta, *181*, *381* (1969).

6. J. CURTIS, F. J. BOURNE, Biochim. Biophys. Acta, *236*, 319 (1971).
7. J. J. METZGER, M. FOUGEREAU, Compt. Rend., *265*, 724 (1967).
8. H. B. KALTREIDER, J. S. JOHNSON, J. Immunol., *109*, 992 (1972).
9. F. J. BOURNE, Biochem. Biophys. Acta, *181*, 485 (1969).
10. J. B. FLEISCHMAN, R. M. PAIN, R. R. PORTER, Arch. Biochim. Biophys. Suppl., *1*, 174—180 (1962).
11. R. A. REISFELD, P. A. SMALL, Science, *152*, 1253 (1966).
12. C. J. O. R. MORRIS, J. Chromat. *16*, 167 (1964).
13. R. PITT-RIVERS, F. S. A. IMPIOMBATO, Biochem. J., *109*, 825 (1968).
14. J. J. METZGER, M. FOUGEREAU, Rech. Veter., *1*, 37 (1968).
15. G. VIRELLA, I. M. COELHO, Immunochemistry, *11*, 157 (1974).
16. C. A. ABEL, H. L. SPIEGELBERG, H. M. GREY, Biochemistry, *7*, 1271 (1968).

ST. CERC. BIOCHIM., 19, 2, 143–149 (1976)

OXIDABILITATEA LA DIFERITE POTENȚIALE, ÎN ORGANELE POMILOR CU ȘI FĂRĂ FRUCTE

ELENA ILIESCU

Rezumat. — S-au urmărit, timp de doi ani, pomii cu (*A*) și fără (*B*) fructe, determinîndu-se oxidabilitatea la potențiale diferite (E_0=0,58, 0,75 și 1,52V), în rădăcini, burse, frunze, muguri vegetativi și floriferi. Substanțele oxidabile pînă la E_0 = = 0,58 V deosebesc numai organele între ele, dar nu pomii *A* de *B*. Cele oxidabile între potențialele 0,58 — 0,75 V deosebesc net pomii *A* de pomii *B*, ultimii diferențiind muguri floriferi: în lunile iulie—august, adică în perioada diferențierii, bursele pomilor *B* conțin cantități mult mai mici față de cele ale pomilor *A*, acestea fiind, probabil, solicitate de muguri. În muguri, ele arată deosebiri distinct semnificative numai în octombrie, la intrarea în repaos, cînd se găsesc în cantitate mai mare în mugurii floriferi. Substanțele oxidabile la potențiale între 0,75—1,52 V, deci cele mai bogate energetic, deosebesc toate organele aeriene ale pomilor *A* și *B*: mugurii floriferi și frunzele aferente lor conțin cantități semnificativ mai mari, pe cînd bursele ce îi poartă — cantități mai mici, față de mugurii vegetativi și frunzele și bursele aferente lor.

În biochimismul celulei, ale cărui schimbări se soldează cu inițierea procesului morfogenetic de diferențiere a mugurilor floriferi de cei vegetativi, un rol deosebit de important trebuie că îl joacă substanțele ce intervin în procesele de oxidare și reducere, ale căror oscilații determină, în celulă, anumite „stări energetice". Aceasta constituie un fapt important, deoarece în special astfel de stări energetice pot declanșa un salt calitativ, atît de vital pentru plantă, cum este inițierea formării elementelor de reproducere. Substanțele oxido-reducătoare trebuie să intervină în procesele exergonice eliberatoare de multă energie, necesară și marcantă a sintezei masive a noilor țesuturi din mugurii florali (1).

În continuarea cercetărilor noastre referitoare la procesul de diferențiere a mugurilor floriferi la măr (2), am urmărit evoluția substanțelor oxido-reducătoare la diferite potențiale, în rădăcini, burse, frunze și muguri, la meri care diferențiau sau nu mugurii floriferi în anul respectiv, fiind cunoscut că o substanță este cu atît mai bogată în energie cu cît oxidarea ei se petrece la un potențial mai ridicat și invers.

MATERIALE ȘI METODE

Materialul vegetal asupra căruia s-au efectuat determinările a fost recoltat și pregătit așa cum s-a arătat în lucrarea anterioară (2). Mugurii s-au prelevat de pe rozetele cu (*A*) sau fără (*B*) fructe, primele purtînd muguri vegetativi, iar ultimele — floriferi.

Determinările s-au efectuat titrimetric, din materialul uscat la temperatura camerei, care s-a extras cu apă, timp de 3 ore, la 50°C, în raportul de 1 g/100 ml. Filtrat prin hîrtie de filtru, extractul a servit tuturor celor trei determinări.

a) Oxidabilitatea cu iod (E_0 = 0,58 V): peste o parte alicotă s-a adăugat un exces de soluție de iod în IK 0,01 N, s-a lăsat la temperatura camerei timp de 1 oră, apoi s-a titrat cu tiosulfat de Na 0,01 N, în prezență

de amidon ; *b*) oxidabilitatea cu fericianură de K (E_0 = 0,75 V) s-a determinat după metoda Hagedorn, pe extractul nedefecat (3) ; *c*) oxidabilitatea cu permanganat de K (E'_0 =1,52V) s-a efectuat prin titrarea, la cald, a unei părți alicote de extract, în prezența a 1 ml H_2SO_4 10%, pînă la menținerea colorației roz timp de 15 secunde. Oxidabilitatea totală (de la E_0 0 la 1,52 V) s-a considerat cea corespunzătoare titrării (*c*) ; oxidabilitatea de la E_0 0 la 0,58 V — cea corespunzătoare titrării (*a*), notîndu-se cu (*a*) ; de la E_0 0,58 la 0,74 V — cea corespunzătoare diferenței *b*—*a*, notîndu-se cu (*b*) ; de la E_0 0,75 la 1,52 V — cea corespunzătoare diferenței *c*—*b*, notîndu-se cu (*c*).

Rezultatele s-au exprimat în ml 0,1 N de I_2, respectiv $K_3Fe(CN)_2$ și $KMnO_4$, la 1 g substanță uscată (s. u.).

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Din rezultatele obținute se observă, ca trăsătură generală, analogia datelor din cei doi ani de studiu, diferențele dintre pomii cu și fără fructe avînd semn schimbat în anul al doilea. Faptul atestă realitatea stării biochimismului plantei, ce poate avea legătură cu procesul diferențierii mugurilor floriferi.

O primă observare a datelor arată deosebirea mare între rădăcini, de o parte și burse și frunze — de altă parte : la primele, în special la cele subțiri (I și II), oxidabilitatea totală este mult mai mare decît la ultimele. Toate cele trei categorii de substanțe (*a*, *b*, *c*), grupate de noi după potențialele de oxidare, se găsesc în cantități mai mari în rădăcini, dar atrag atenția, în special, cele cu potențial mic de oxidare (*a*), corespunzătoare iodului : în rădăcinile subțiri (I și II) ele se găsesc în cantități chiar duble (tabelele 1 și 2) față de burse și frunze. Această primă categorie de substanțe nu indică, însă, o deosebire netă între rădăcinile pomilor cu și fără fructe. Substanțele (*b*), cu E_0 mai ridicate, mai bogate în oxigen, se găsesc în cantități de 7—8 ori mai mari decît cele din categoria (*a*). În timpul perioadei de vegetație pomii *B*, care vor diferenția muguri floriferi, conțin cantități semnificativ mai mari din aceste substanțe (tabela 1), situația schimbîndu-se în luna ianuarie, cînd — după cum s-a văzut și din lucrarea anterioară (2) — rădăcinile încep o activitate metabolică intensă. Substanțele (*c*), cu E_0 cel mai ridicat, arată valori semnificativ mai mari la pomii *B*, ce vor diferenția, în cazul special al rădăcinilor mai subțiri (I și II).

Rădăcinile pomilor au cantități mai mari de substanțe reducătoare decît organele aeriene probabil pentru că aici ar fi mai intense procesele de reducere asupra unor compuși absorbiți din sol și prelucrați pentru a fi transportați către celelalte organe.

Bursele conțin substanțe (*a*) în cantități și cu diferențe neglijabile (tabelele 2 și 3). În schimb, substanțele (*b*) în aprilie-mai se găsesc în cantități semnificativ mai mici la pomii *A* decît la *B*, ele fiind, desigur, trecute masiv în flori și fructele abia legate și în plină diviziune celulară. În iulie ele cresc cantitativ în bursele producătoare de fructe (*A*), mai ales față de cele fără (*B*), purtătoare de muguri ce se diferențiază și în care scăderea continuă. În septembrie-octombrie se manifestă creșteri în ambele feluri de burse, dar mai mult în (*A*). Reiese că bursele ar constitui o „anticameră" pentru substanțele ce sînt solicitate inegal, în timp, de organele purtate

Tabela 1

Oxidabilitatea, în rădăcini, la diferite potenţiale
(ml I_2 (*a*) ; $K_3Fe(CN)_6$ (*b*) ; $KMnO_4$ (*c*) 0,1 N/g s.u.) (media a trei repetiţii)

Data	0—0,58 V (*a*)		0,58—0,75 V (*b*)				0,75—1,52 V (*c*)					Totală	
	Pomi cu fructe (*A*)	Pomi fără fructe (*B*)	Pomi cu fructe (*A*)	Pomi fără fructe (*B*)	Semnific. diferenţa *A* — *B*	DL 5%	Pomi cu fructe (*A*)	Pomi fără fructe (*B*)	Semnific. diferenţa *A* — *B*	DL 5%	DL 1%	Pomi cu fructe (*A*)	Pomi fără fructe (*B*)
						I Ø = 3 mm							
13.V 1970	5,17	5,95	33,15	37,03	—		51,19	51,92	—			89,49	94,90
21.VII „	6,01	7,44	34,38	37,02	0	3,06	68,11	79,10	00		8,15	108,50	123,56
21.X „	8,16	7,65	21,79	30,43	0	3,03	107,60	109,55	—			137,57	147,63
25.I 1971	7,22	8,06	43,86	40,84	×	3,01	80,79	91,58	00		8,15	131,87	140,48
17.V „	6,15	5,94	40,89	38,02	—		64,82	63,95	—			111,86	107,91
						II Ø = 5—10 mm							
13.V 1970	4,96	4,75	34,98	30,25	×	3,02	48,82	53,98	0	3,54		88,76	88,98
21.VII „	5,32	5,90	34,59	35,52	—		54,67	66,64	00		8,19	94,58	108,06
21.X „	5,04	5,49	37,60	42,05	0	3,06	55,28	57,63	—			97,92	105,62
25.I 1971	4,04	4,72	34,70	36,93	—		52,25	56,37	0	3,48		90,99	98,02
17.V „	5,06	4,98	32,33	35,00	0	2,70	52,23	47,68	×	3,50		89,62	87,66
						III Ø = 11—20 mm							
13.V 1970	3,17	3,79	27,10	25,11	—		29,19	34,53	0	4,02		59,46	63,43
21.VII „	3,80	4,09	20,17	23,65	0	3,08	41,05	43,06	—			65,02	70,80
21.X „	4,06	4,24	28,13	20,56	×	3,04	25,58	33,14	0	5,74		57,77	57,94
25.I 1971	3,93	3,35	27,93	30,70	—		34,74	35,36	—			66,60	69,41
17.V „	4,08	3,33	25,96	29,63	0	3,27	37,15	30,42	×	5,52		67,19	63,38

Tabela 2

Oxidabilitatea în burse, frunze şi muguri, la diferite potenţiale
(ml I_2(a), $K_3Fe(CN)_6$ (*b*), $KMnO_4$ (*c*) 0,1 N/g s.u.) (media a trei repetiţii)

Data	0–0,58 V (*a*)		0,58–0,75 V (*b*)					0,75–1,52 V (*c*)						Totală	
	Pomi cu fructe (*A*)	Pomi fără fructe (*B*)	Pomi cu fructe (*A*)	Pomi fără fructe (*B*)	Semnific. diferenţa *A* – *B*	DL 5%	DL 1%	Pomi cu fructe (*A*)	Pomi fără fructe (*B*)	Semnific. diferenţă *A* – *B*	DL 5%	DL 1%	DL 0,1%	Pomi cu fructe (*A*)	Pomi fără fructe (*B*)
								Burse							
3.IV 1970	4,05	3,94	31,12	37,77	0	3,14		62,39	59,84	×	3,07			97,56	101,55
15.V „	3,78	3,72	21,38	26,35	0	3,14		34,49	25,73	××		8,13		59,65	55,88
16.VI „	3,44	3,45	17,56	19,45	—			35,81	28,62	×	3,17			56,81	51,52
16.VII „	3,52	3,15	21,01	17,75	×	3,08		41,96	40,86	—				66,49	61,76
17.VIII „	3,11	3,08	22,22	17,44	××		4,52	47,57	41,82	××		8,24		72,90	62,34
10.IX „	3,56	3,70	23,99	20,95	×	3,06		37,80	30,93	×	2,00			65,35	55,58
20.X „	4,02	3,78	42,99	41,96	—			20,59	18,51	—				67,60	64,25
								Frunze							
15.V „	4,59	4,40	38,84	39,99	—			27,94	35,95	0	5,13			71,37	80,34
16.VI „	2,92	3,34	22,43	26,64	—			44,48	50,74	00		8,27		69,83	80,72
16.VII „	3,84	3,42	26,28	25,81	—			54,42	63,07	0	5,13			84,54	92,30
17.VIII „	4,74	4,79	24,69	25,72	—			48,50	63,42	00		8,14		77,93	93,93
10.IX „	4,00	3,74	25,86	22,07	—			53,30	67,12	00		8,14		83,16	92,93
								Muguri							
17.VIII „	6,95	6,73	29,89	31,96	—			75,77	73,04	—				112,61	111,73
10.XI „	7,36	7,35	34,75	35,86	—			82,00	88,74	0	5,10			124,11	131,25
20.X „	6,01	7,47	29,06	36,12	00		5,62	45,26	73,60	000			19,15	80,33	117,19

Tabela 3

Oxidabilitatea în burse, frunze și muguri, la diferite potențiale
(ml I_2(*a*), $K_3Fe(CN)_6$ (*b*), $KMnO_4$(*c*) 0,1 N/g s.u.) (media a trei repetiții)

Data	0–0,58 V (*a*)		0,58–0,75 V (*b*)					0,75–1,52 V (*c*)						Totală	
	Pomi fără fructe (*A*)	Pomi cu fructe (*B*)	Pomi fără fructe (*A*)	Pomi cu fructe (*B*)	Semnific. diferența *A*–*B*	DL 5%	DL 1%	Pomi fără fructe (*A*)	Pomi cu fructe (*B*)	Semnific. diferența *A*–*B*	DL 5%	DL 1%	DL 0,1%	Pomi fără fructe (*A*)	Pomi cu fructe (*B*)
								Burse							
5.IV. 1971	4,04	3,81	30,67	24,92	××		3,98	36,18	42,78	0	3,40			70,89	51,51
18.V ,,	4,33	4,31	20,34	18,65	×	1,72		33,10	37,93	0	3,28			53,44	60,89
18.VI ,,	3,71	3,57	25,16	25,58	—			31,27	36,74	0	3,32			60,14	66,59
28.VII ,,	2,47	2,90	16,61	15,24	—			42,91	54,02	00		7,81		61,99	72,16
30.VIII ,,	2,88	3,26	14,27	15,89	0	1,70		47,09	52,90	0	3,26			64,24	72,05
23.IX ,,	3,21	3,35	15,01	17,28	0	1,82		40,87	42,38	—				58,09	62,01
21.X ,,	4,40	4,42	30,47	29,69	—			27,77	36,26	00				62,94	70,37
								Frunze				7,78			
18.V ,,	4,07	5,19	28,45	27,33	—			49,29	37,54	×	3,12			81,81	70,07
18.VI ,,	3,59	3,87	26,34	24,92	—			45,12	39,69	×	3,40			75,05	68,48
28.VII ,,	3,90	3,99	29,06	28,27	—			50,38	39,49	××		8,27		82,34	70,75
30.VIII ,,	3,46	3,34	29,46	27,30	—			68,62	68,70	—				101,54	99,34
23.IX ,,	2,47	2,77	29,95	27,08	—			74,32	71,49	×	3,10			107,14	101,14
								Muguri							
18.VI ,,	4,87	5,76	38,75	37,96	—			75,40	65,30	××		10,01		119,02	109,02
28.VII ,,	3,84	4,44	25,44	25,10	—			43,82	37,90	×	5,10			73,10	67,44
30.VIII ,,	5,15	5,39	32,30	33,85	—			50 29	47,42	—				87,74	86,66
23.IX ,,	5,44	5,82	33,85	32,74	—			71,33	56,01	××		10,52		110,62	94,57
21.X ,,	6,60	5,76	38,56	28,82	××		5,56	62,69	42,59	×××			19,01	107,85	77,17

(fructe, muguri). Astfel, la legare și începutul dezvoltării fructelor, în bursele purtătoare ale acestora se găsesc mai puține substanțe (*b*), ele fiind solicitate intens de procesele active din fructe; în bursele fără fructe se găsesc mai multe — nesolicitate încă. În iulie, cînd creșterea fructelor încetează să aibă loc prin diviziunea celulelor, continuînd numai prin mărirea volumului lor, în burse crește cantitatea acestor substanțe; iar în bursele fără fructe, cînd începe diferențierea mugurilor floriferi, deci cu procese active de diviziune în aceștia, în burse scade cantitatea substanțelor (*b*). În bursele cu fructe acestea cresc cantitativ ușor și continuu, pînă toamna, iar la culesul fructelor cresc brusc, ca și în bursele cu muguri floriferi care au intrat, acum, în repaus. Deci, această categorie de substanțe oscilează cantitativ, și semnificativ, după țesuturile în care se petrec procese active de diviziune celulară, consumatoare de multă energie, necesară anabolismului.

În frunze, substanțele cu potențiale medii (*b*) nu variază semnificativ. Din cele din categoria (*c*) ele conțin cantități mai mici cînd sînt situate pe bursele *A*, acestea fiind, probabil, transportate activ către fructe.

În muguri se găsește o cantitate mai mare de substanțe cu E_0 mici (*a*), decît la celelalte organe, dar nu îi diferențiază semnificativ. Substanțele (*b*), de asemenea, nu manifestă diferențe notabile în timpul diferențierii mugurilor, dar semnificația lor se evidențiază distinct în octombrie, cînd etapa diferențierii a fost terminată, în pragul intrării în repaos: mugurii floriferi conțin o cantitate mai mare din acestea. Probabil că în aceștia, în timpul diferențierii lor, substanțele (*b*) nu se pot acumula, ele consumîndu-se imediat, pe măsura aportului lor activ din burse (unde, de fapt, cantitatea lor este mai mică decît în bursele cu fructe). Numai o dată cu stagnarea diferențierii masive și intrarea mugurilor în repaus acestea, nemaifiind folosite, își vădesc prezența în cantitate mai mare. În privința substanțelor (*c*), o cantitate mai mare se află în mugurii floriferi, de-a lungul întregii perioade de vegetație, cu excepția lunii august, cînd valorile se apropie foarte mult, prin creșterea conținutului acestora în mugurii vegetativi. Numai în luna octombrie, la intrarea în repaus, în mugurii vegetativi ele scad brusc, la aproape jumătate din cantitatea lunii anterioare.

CONCLUZII

În privința prezenței substanțelor cu potențiale diferite de oxidare, și deci de potențial energetic diferit, organele subterane ale merilor se deosebesc de burse și frunze, indicînd metabolisme ce nu se desfășoară pe căi metabolice identice.

Bursele și frunzele conțin o cantitate neglijabilă de substanțe cu potențiale mici (0—0,58 V), pe cînd rădăcinile subțiri le conțin în cantități duble, deși această categorie nu deosebește pomii cu de cei fără fructe.

Substanțele cu potențiale ceva mai ridicate (0,58—0,75 V) deosebesc net pomii cu de cei fără fructe, pe ultimii diferențiindu-se mugurii floriferi pentru recolta anului viitor. Acestea par să joace un rol deosebit în procesul diferențierii: în burse se produce o inversare a conținutului lor tocmai în lunile iulie și august, cînd se știe că se petrece procesul de diferențiere a mugurilor.

Substanțele cu potențialul de oxidare cel mai ridicat (0,75 — 1,52 V) diferențiază toate organele cercetate ale pomilor cu și fără fructe : bursele purtătoare de fructe conțin o cantitate mai mare din acestea, iar frunzele de pe aceste burse — mai mică, atestînd un transport al acestora din frunze spre burse, unde se acumulează. Bursele pe care se diferențiază mugurii floriferi conțin o cantitate mai mică, ele fiind, probabil, consumate avid de muguri.

Mugurii, în perioada diferențierii lor, conțin substanțe cu potențial scăzut asemănător, cantitativ, rădăcinilor, dar care nu-i deosebesc decît în octombrie, în pragul intrării în repaus : se găsesc în cantitate mai mare în cei floriferi. Aceeași situație o prezintă și substanțele cu potențial de oxidare mijlociu. În schimb, cele cu potențial de oxidare ridicat îi deosebesc tot timpul : în cantități mult mai mici în mugurii floriferi în lunile august-septembrie și aproape cu jumătate mai mult în octombrie, față de mugurii vegetativi.

Prezentat la redacție la 29 ianuarie 1975

Stațiunea experimentală pomicolă
Voinești-Dîmbovița

OXIDABILITY AT DIFFERENT POTENTIALS, IN THE ORGANS OF TREES BEARING OR NOT FRUITS

SUMMARY

Studies were conducted for two years on trees bearing (A) or not (B) fruits, the oxidability at different potentials (E_0 = 0.58, 0.75 and 1.52 V) being determined in the roots, pouches, leaves and vegetative and flower buds.

Substances oxidable up to E_0 = 0.58 V (a) are able only to differentiate some organs from the others, but not A trees from B ones.

Substances oxidable at potentials between 0.58 and 0.75 V (b) distinctly differentiate A trees from B ones, flower buds being the last to differentiate : during July—August, that is during the differentiation period, far lower amounts were detected in B than in A pouches, possibly due to the fact that these are needed by the buds. In the buds, the (b) substances showed distinctly significant differences only during October, at the beginning of dormancy, when higher amounts occur in the flower buds.

Substances oxidable at higher potentials (E_0 = 0.75 to 1.52 V) (c), that is showing the highest energetic ability, are able to differentiate all the above-ground organs of A and B trees : the flower buds, as well as their afferent leaves, contain significant higher amounts, but lower ones in the pouches bearing them, as compared to the vegetative buds and their afferent leaves and pouches.

BIBLIOGRAFIE

1. Elena Iliescu, St. cerc. biochem., **12**, 345 (1969).
2. Elena Iliescu St. cerc. biochim., **18**, 3 (1975).
3. A. Belozerski, I. Proskuriakov, *Prakticeskie rukovodstvo po biohimii rastenii*, Gosud. izd. selkohoz. lit., Moskva, 1951.

ST. CERC. BIOCHIM. 19, 2, 151–153 (1976)

CERCETAREA BIOSTRUCTURII ȚESUTULUI MUSCULAR UTILIZÎND METODA STOARCERII

II. PROGRAM FORTRAN PENTRU CALCULAREA CANTITĂȚII DE APĂ LIBERĂ DIN ȚESUTUL MUSCULAR.

M. E. MACOVSCHI și OLGUȚA MACOVSCHI

Facultatea de tehnologie, disciplina de chimie-fizică, Institutul de petrol și gaze — Ploiești.
Facultatea de farmacie, disciplina de biochimie, Institutul de medicină și farmacie — București

Rezumat. — Se prezintă un program FORTRAN cu ajutorul căruia pe baza datelor experimentale (volum de suc) = *f* (timp) se poate calcula cantitatea reală de apă liberă dintr-o probă de țesut muscular.

Pentru studiul biostructurii diferitelor țesuturi este important să se cunoască exact procentele de apă liberă, legată și biostructurată din aceste țesuturi. În nota anterioară (1) am arătat că prin comprimarea un timp limitat — cca. 1 oră — a țesutului muscular, nu se poate provoca eliminarea integrală a apei libere din țesut. O prelungire a timpului de stoarcere nu rezolvă problema : din calcule teoretice (1) rezultă că eliminarea a 90 % din apa liberă ar putea dura uneori chiar și zeci de ore ; un asemenea timp de stoarcere este însă inacceptabil deoarece materialul experimentat se poate modifica sensibil.

Am arătat anterior (1) că dinamica stoarcerii sucurilor (apei) din țesutul muscular, viu sau omorît, este descrisă de ecuația

$$V = V_M\left(1 - \frac{1}{1 + a \cdot t^b}\right) \qquad (1)$$

în care V_M reprezintă volumul maxim de suc ce ar putea fi stors din țesut corespunzător unui timp de stoarcere infinit. Rezultă deci că urmărind dinamica stoarcerii sucului și apoi determinînd prin calcul parametrii V_M, a și b, se poate determina cu precizie cantitatea de apă liberă din țesutul muscular.

În nota de față prezentăm un program de calcul corespunzător scopului arătat, scris în limbaj FORTRAN. Programul este utilizabil pe calculatoare IBM-360, Felix-C-256, IRIS-50 etc. Parametrii V_M, a și b se determină prin calcularea de curbe de stoarcere teoretice pentru diferite valori ale lui V_M, a și b, și compararea acestora cu datele experimentale ; concordanța optimă se stabilește prin metoda celor mai mici patrate.

Prezentăm în continuare modul de utilizare al programului.

a) *Cartelele cu date.* Programul prelucrează curbe cu pînă la 48 de puncte experimentale ; este recomandabil pentru precizia calculelor ca numărul de puncte să nu fie mai mic de 15. Datele se dau pe 2—6 cartele, astfel :

— o cartelă în care se indică : numărul de puncte ale curbei, greutatea probei de mușchi (în grame) și un text de maximum 40 de semne pentru identificarea setului de date. FORMAT (I2,8X, F5.1, 5X, 10A4)

— 1—5 cartele cu perechile de valori timp-volum de suc, ale punctelor experimentale. FORMAT (10(F3.1, F5.2))

b) *Inițializări.* Prin instrucțiuni DATA se stabilesc condițiile de calcul :

— GRF : greutatea standardizată a probelor la care se raportează rezultatele (în grame) pentru a putea fi comparate ;

— INDTP ; INDVMP : indici pentru precizia calculului ; iau valori de la 1 la 7, indicînd numărul de trepte de precizie în calcularea parametrilor b și respectiv V_M ;

— TP ; VMP : mărimi ce precizează numeric treptele de precizie (valoarea pasului de variație a valorilor de încercare pentru b, respectiv V_M) ; prima valoare a lui TP trebuie să fie pozitivă ; valorile lui TP și VMP au semne alternative +, —, +, — ...)

— NNR ; NNW : indici pentru desemnarea perifericelor calculatorului : pentru IBM : NNR = 1, NNW = 3 ; pentru Felix : NNR = 105, NNW = 108.

c) Se pot prelucra oricîte seturi de date ; după ultimul set de date se pune o cartelă „End of file". Programul verifică datele de intrare (*a*) și în cazul unor erori afișează mesaje corespunzătoare și trece automat la prelucrarea următorului set de date.

d) Rezultate. Rezultatele sînt imprimate ca în exemplul alăturat ; coloanele au următoarele semnificații ;

— NR : numărul curent al punctului de pe curbă ; TIME : timpul (valoare experimentală) ; X*EXP* : valoarea experimentală a volumului de suc, stors din proba de greutate G ; X*REL* : valoarea volumului de suc, raportat la o greutate standardizată a probei, specificată prin GRF ; CONSTANT : valoarea constantei din relația (2′) din nota 1 ; CT-CTMED : diferența dintre constanta calculată pentru punctul considerat și valoarea medie a constantei pentru toate punctele : ERROR (%) : eroarea, în procente, a constantei pentru punctul dat față de constanta medie.

Se mai afișează de asemenea opt mărimi a căror semnificație este evidentă precum și unele date de inițializare.

În cazul unui calcul corect, valorile înscrise în coloanele de la CALCULUS RUN trebuie să varieze astfel :

— LIMT : indică numărul fiecărei încercări pentru calculul lui b ; variază cu cîte o unitate ;

— EXPOT : valoarea încercată pentru b (exponentul lui t) ; variația trebuie să se facă strict cu diferențe corespunzătoare pașilor din TP ; prima valoare este 0,01 ;

— LIM : arată numărul de încercări pentru determinarea lui V_M pentru un exponent b dat ; LIM poate avea uneori o valoare maximă egală cu 55 + 19*INDVMP ;

— VM : arată valoarea lui V_M considerată optimă pentru un exponent dat ; V_M trebuie să conveargă către o valoare finală, odată cu convergența lui EXPOT ; cînd LIM are valoarea maximă și VM are o valoare maximă (depinzînd de VMP) ;

— SMT : indică valoarea sumei celor mai mici patrate ; trebuie să conveargă către o valoare minimă.

Exemplul de tabel de rezultate permite verificarea corectei reproduceri a programului.

STUDY ON THE BIOSTRUCTURE OF THE MUSCLE TISSUE BY THE SQUEEZING METHOD

II. FORTRAN PROGRAM FOR CALCULATING THE AMOUNT OF FREE WATER IN THE TISSUE MUSCLE

SUMMARY

A FORTRAN program is presented for calculating the real amount of free water in the muscle tissue, based on experimental data, i. e. volume of sap expressed as a function of time.

BIBLIOGRAFIE

1. Olguța Macovschi, M. E. Macovschi, *Investigation of the muscle tissue biostructure by means of the pressing-out method. I. Pressing-out dynamics of the saps obtained from the striated muscle tissue.* Biochimica e biologia sperimentale (sub tipar).

ST. CERC. BIOCHIM. 19, 2, 155–163 (1976)

PROTEINELE SARCOPLASMATICE ACVOSOLUBILE ÎN BIOSTRUCTURA ȚESUTULUI MUSCULAR STRIAT DE IEPURE

OLGUȚA MACOVSCHI

Rezumat. — Sînt studiate, din punctul de vedere al concepției biostructurale, proteinele sarcoplasmatice acvosolubile din țesutul muscular striat de iepure, urmărindu-se: repartiția lor cantitativă și calitativă, între biostructură și apa liberă tisulară, factorii care influențează eliberarea lor la destrămarea biostructurii. De asemenea, este cercetată repartiția între biostructură și apa liberă tisulară a fructozo-1,6-difosfat liazei, enzimă tipică pentru metabolismul muscular.

Cercetările efectuate pînă acum (1 — 3) asupra biostructurii țesutului muscular striat, au confirmat că și pentru acest material biologic, o parte a apei și ionilor de potasiu și sodiu, se găsește sub formă integrată în biostructură, o altă parte fiind în stare solvită în soluția intraplasmatică. Totodată s-a arătat că destrămarea biostructurii, destrămare ce are loc odată cu moartea țesutului muscular, duce la eliberarea componentelor biostructurale care se adaugă la materia nevie protoplasmatică și ea decurge în moduri diferite în funcție de condițiile în care se găsește biostructura.

În continuarea cercetării biostructurii țesutului muscular striat, ne-am propus să examinăm proteinele sarcoplasmatice acvosolubile, categorie importantă de componente ale țesutului muscular striat avînd în vedere rolul pe care îl îndeplinesc și anume majoritatea fiind enzime ce participă la procesele biochimice celulare (4). Or, conform concepției biostructurale, biochimismul celular se desfășoară în materia nevie a ansamblului protoplasmatic, dar este reglat și condus de biostructură (5, 6); această reglare a biochimismului se realizează prin integrarea sau eliberarea din biostructură a diferitelor substanțe sau enzime participante la reacțiile biochimice celulare.

Ca urmare am considerat că pentru studiul, din punctul de vedere al concepției biostructurale, al proteinelor sarcoplasmatice acvosolubile, interesează:

— repartiția lor, cantitativă și calitativă, între biostructură și apa liberă tisulară;

— factorii care influențează eliberarea proteinelor sarcoplasmatice la destrămarea biostructurii;

— repartiția între biostructură și apa liberă tisulară a unora dintre enzimele metabolismului celular. În acest sens am ales drept exemplu D-fructozo-1,6-difosfat D-gliceraldehid-3-fosfatliaza (EC. 4.1.2.6) sau aldolaza, enzimă tipică pentru metabolismul muscular.

Pentru a cerceta repartiția cantitativă a proteinelor acvosolubile între biostructură și apa liberă tisulară am determinat cantitatea acestora în sucurile interstițial, plasmatic și mixt. Diferențele calitative au fost cercetate prin separarea cromatografică pe DEAE-celuloză a sucurilor

interstiţial şi plasmatic; în sfîrşit, activitatea aldolazei a fost cercetată prin determinarea activităţii acestei enzime în sucurile interstiţial şi plasmatic.

MATERIALE ŞI METODE

Am lucrat pe probe de 45—50 g muşchi striaţi din coapsă de iepure, animalul fiind omorît prin exsanguinare. Ţesutul muscular a fost folosit în stare vie şi omorît în diferite moduri: prin congelare cu zăpadă carbonică şi decongelare, prin păstrare 24 ore la —10° şi prin păstrare 24 ore la +4°.

Obţinerea sucurilor interstiţiale, plasmatice şi mixte s-a realizat după tehnica descrisă anterior (1—3).

Concentraţia şi cantitatea proteinelor s-a determinat prin metoda biuretului (7) după diluarea cu ser fiziologic a sucurilor în proporţie de 1 : 20 pentru sucurile interstiţiale şi 1 : 40 pentru sucurile plasmatice şi mixte. Pentru curba standard s-a folosit serumalbumină bovină „Mann Lab."

Separarea proteinelor prin cromatografie s-a făcut în gradient continuu de KCl pe o coloană de DEAE-celuloză p. a. (Serva tip DEAE-SS) la două valori de pH : 7,6 şi 9,4, valori de pH care conform indicaţiilor din literatură (4, 8—9) sînt optime pentru separarea unor extracte de ţesut muscular striat. Dimensiunile coloanei au fost 180 × 18 mm. Soluţiile tampon testate au fost : (1) tampon Tris — HCl 2.10^{-2} m pH = 7,6 ; (2) tampon Tris — HCl 5.10^{-3} m, pH = 7,6 ; (3) tampon glicocol — NaOH $4 \cdot 10^{-2}$ m, pH = 9,4. Separările efectuate în tamponul (1) sînt mai puţin nete decît cele efectuate în tamponul (2) ; astfel, pentru sucul interstiţial, în tamponul (1) se obţin 5 fracţiuni proteice (fig. 1) în timp ce în tamponul (2) se disting cel puţin 6 fracţiuni bine conturate (fig. 2). Ca urmare în determinări, pentru pH = 7,6 s-a folosit tamponul (2).

Gradientul continuu de KCl, cuprins între 0 şi 0,7 m, se aplica după ce din coloană ieşea prima fracţiune proteică şi era verificat prin titrare cu $AgNO_3$ n/20.

Cantitatea de proteină trecută prin coloană a fost de cca. 60—85 mg iar eluţia fracţiunilor a fost efectuată la 22°, cu un debit de 16 — 18 ml pe oră.

Pentru colectarea fracţiunilor — în volum de 2 ml — s-a folosit un colector automat de fracţiuni LKB tip Ultrorac compact ; controlul separării fracţiunilor s-a făcut cu o celulă de fotometrare continuă la 280 nm (tip Uvicord II, LKB 8303).

Activitatea aldolazei a fost determinată în sucurile interstiţiale, plasmatic şi mixt, diluate 1/200 — 1/300, după metoda Sibley şi Lehninger (10), folosind drept substrat fructozo-1,6-difosfat, sare de sodiu, în tampon Tris la pH = 8,6, hidrazina ca agent de prindere a triozofosfaţilor şi 2,4-dinitrofenilhidrazina ca reactiv de culoare. Citirea extincţiei s-a făcut la 535 nm. Rezultatele au fost exprimate în μM triozofosfat eliberat de enzimă pentru un timp de incubare de 1 minut la 38°, în raport cu o curbă etalon (extincţie cromogen) /(μM triozo-fosfat eliberat), construită după metoda Sibley şi Lehninger (10).

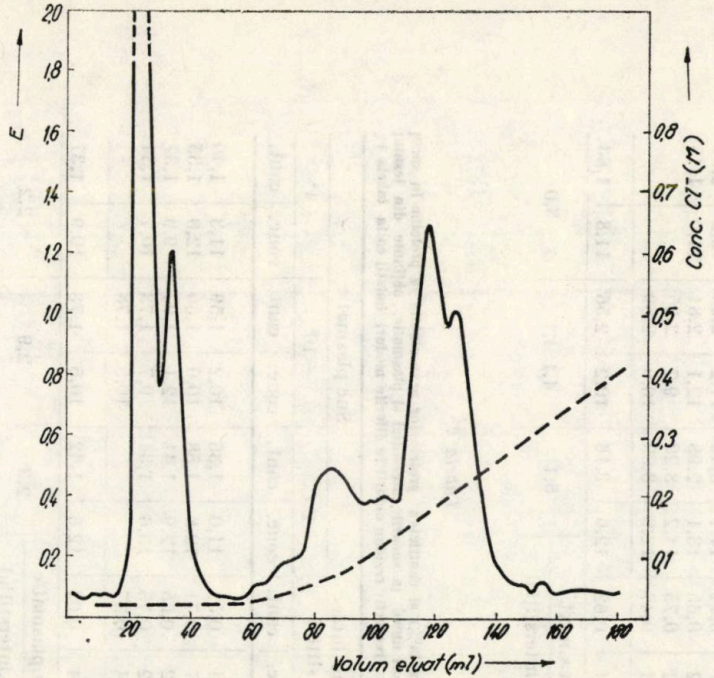


Fig. 1. — Separarea prin cromatografie pe DEAE-celuloză a proteinelor acvosolubile din sucul interstiţial; tampon Tris-HCl 2.10^{-2}m; viteză de eluţie 19 ml/oră; gradient KCl.

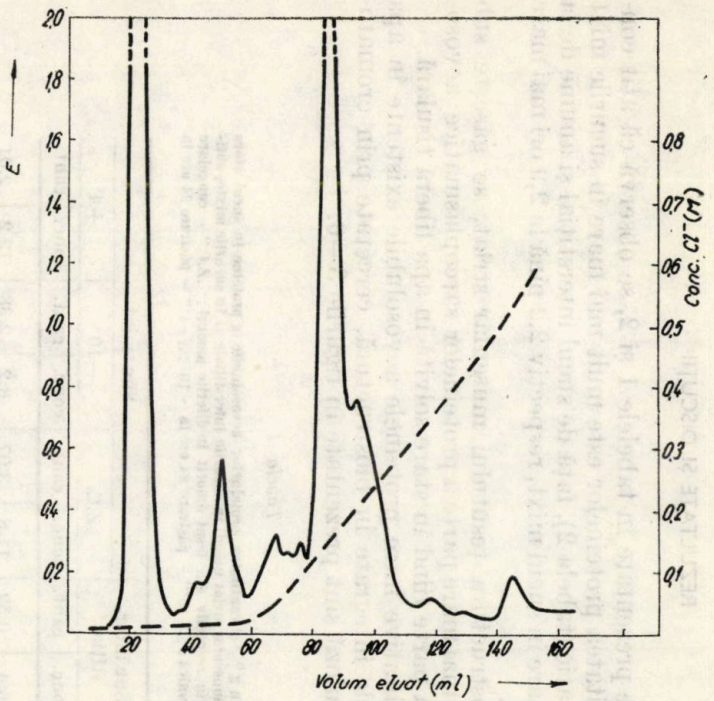


Fig. 2. — Idem ca în figura 1; tampon Tris-HCl 5.10^{-3}m; viteză de eluţie 19 ml/oră.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Din rezultatele prezentate în tabelele 1 şi 2, se observă că atît concentraţia cît şi cantitatea proteinelor este mult mai mare în sucurile mixt (tabela 1) sau plasmatic (tabela 2), faţă de sucul interstiţial şi anume de la 3 pînă la 5 ori mai mare în sucul mixt, respectiv 2,2 pînă la 2,9 ori mai mare în sucul plasmatic.

Aşadar, în biostructura ţesutului muscular striat, se găseşte sub formă integrată cea mai mare parte a proteinelor sarcoplasmatice acvosolubile, numai o mică parte fiind în stare solvită în apa liberă tisulară.

Diferenţele calitative între proteinele acvosolubile existente în apa liberă tisulară şi cele integrate în biostructură, cercetate prin cromatografie pe DEAE-celuloză sînt prezentate în figurile 3—6.

Tabela 1

Concentraţia (în g %) şi cantitatea proteinelor acvosolubile (g proteine în sucul stors din 100g ţesut muscular striat umed) în sucurile interstiţiale şi în sucurile mixte, obţinute din ţesut viu, respectiv din ţesut omorît în diferite moduri: „Z.C." — congelare cu zăpadă carbonică; „—10°" — păstrare 24 ore la —10°; „+4°" — păstrare 24 ore la +4°.

Nr.	Suc interstiţial		Suc mixt					
			Z.C.		—10°		+4°	
	conc.	cant.	conc.	cant.	conc.	cant.	conc.	cant.
1	6,4	0,52	11,8	3,07	8,2	2,38	12,2	2,01
2	6,7	0,71	11,7	3,46	11,2	2,66	12,2	2,01
3	6,2	0,65	13,1	2,98	12,1	2,81	11,0	1,45
4	7,2	0,75	14,2	3,20	9,7	2,35		
5	5,4	0,47	12,9	3,09	10,0	2,59		
media	6,4	0,62	12,6	3,16	10,2	2,56	11,8	1,83
cant.prot.s.mixt / cant.prot.s.interstiţial			5,1		4,1	4,1	3,0	

Tabela 2

Concentraţia (în g la%) şi cantitatea proteinelor acvosolubile (g proteine în sucul stors din 100g ţesut umed) în sucurile interstiţial şi plasmatic, obţinute din ţesutul muscular striat viu, respectiv reziduu omorît în diferite moduri (notaţii ca la tabela 1).

Nr.	Suc interstiţial		Suc plasmatic					
			Z.C.		—10°		+4°	
	conc.	cant.	conc.	cant.	conc.	cant.	conc.	cant.
1	6,4	0,52	11,0	1,36	10,2	1,59	11,3	1,40
2	6,7	0,71	12,8	1,58	10,0	1,60	12,0	1,35
3	6,2	0,65	12,9	1,41	12,1	1,97	9,9	1,37
4	7,2	0,75	13,6	1,34	9,7	1,73	10,7	1,34
5	5,4	0,47			10,5	1,78		
media	6,4	0,62	12,6	1,42	10,5	1,73	10,9	1,37
cant.prot.s.plasmatic / cant.prot.s.interstiţial			2,3		2,9		2,2	

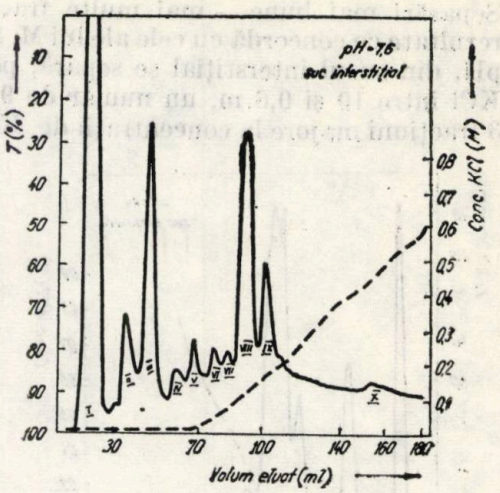


Fig. 3. — Cromatografia pe DEAE-celuloză a proteinelor sarcoplasmatice acvosolubile din sucul interstițial, în gradient continuu de concentrație de KCl, la pH = 7,6

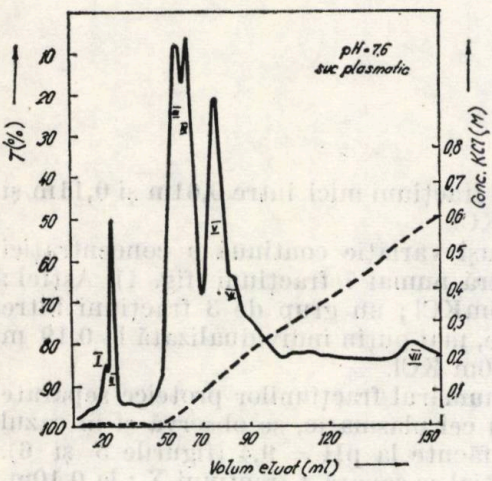


Fig. 4. — Cromatografia pe DEAE-celuloză a proteinelor sarcoplasmatice acvosolubile din sucul plasmatic, în gradient continuu de concentrație de KCl, la pH = 7,6

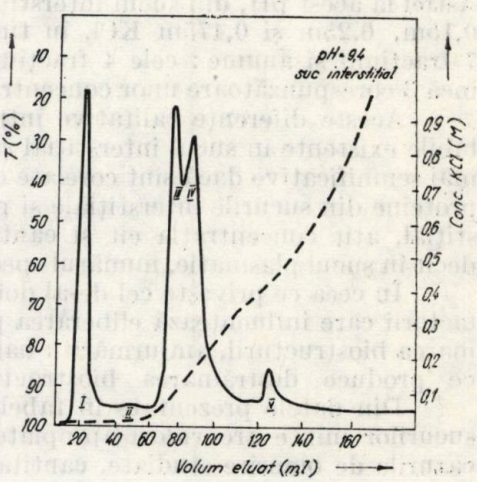


Fig. 5. — Cromatografia pe DEAE-celuloză a proteinelor sarcoplasmatice acvosolubile din sucul interstițial, în gradient continuu de KCl, la pH = 9,4

Separări mai bune — mai multe fracţiuni — s-au obţinut la pH = 7,6 rezultate ce concordă cu cele ale lui M. Şerban şi D. Tănăsescu (8). La acest pH, din sucul interstiţial se separă, pentru o variaţie a concentraţiei de KCl între 10 şi 0,6 m, un număr de 9—10 fracţiuni (fig. 3) dintre care: 3 fracţiuni majore la concentraţii de KCl de 0,01, 0,02, şi 0,15 m; 2 frac-

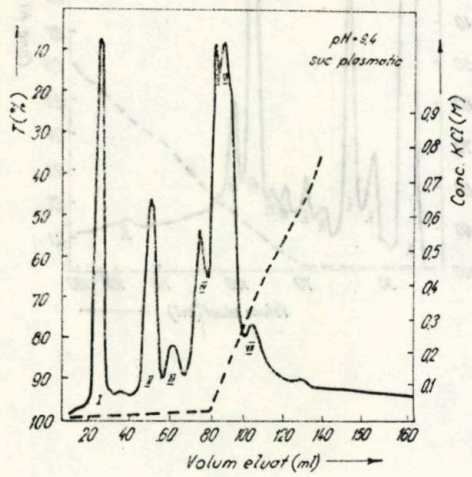


Fig. 6. — Cromatografia pe DEAE-celuloză a proteinelor sarcoplasmatice acvosolubile din sucul plasmatic, în gradient continuu de KCl, la pH = 9,4

ţiuni medii la 0,01 m şi 0,16 m; 3—4 fracţiuni mici între 0,01m şi 0,11m şi în sfirşit o mică fracţiune la 0,47m KCl.

La acelaşi pH şi pentru aceeaşi variaţie continuă a concentraţiei de KCl, din sucul plasmatic se separă numai 7 fracţiuni (fig. 4). Astfel: 2 fracţiuni la concentraţia de 0,005mKCl; un grup de 3 fracţiuni între 0,01m şi 0,175mKCl; o altă fracţiune, mai puţin individualizată la 0,19 m şi o ultimă fracţiune, minoră, la 0,550m KCl.

Diferenţe în ceea ce priveşte numărul fracţiunilor proteice separate din sucul interstiţial, comparativ cu cel plasmatic, se observă şi în cazul cînd separările cromatografice sînt făcute la pH = 9,4 (figurile 5 şi 6). Astfel la acest pH, din sucul interstiţial se separă 4 fracţiuni X: la 0,10m, 0,15m, 0,25m şi 0,475m KCl, în timp ce din sucul plasmatic se separă 7 fracţiuni şi anume: cele 4 fracţiuni evidenţiate în sucul interstiţial şi încă 3 corespunzătoare unor concentraţii de KCl de 0,01m, 0,02m şi 0,03m.

Aceste diferenţe calitative între proteinele sarcoplasmatice acvosolubile existente în sucul interstiţial şi cele integrate în biostructură sînt şi mai semnificative dacă sînt corelate cu concentraţia şi cantitatea totală de proteine din sucurile interstiţiale şi plasmatice. Astfel, deşi în sucul interstiţial, atît concentraţia cît şi cantitatea totală de proteine sînt mai mici decît în sucul plasmatic, numărul speciilor proteice prezente este mai mare.

În ceea ce priveşte cel de-al doilea obiectiv propus şi anume care sînt factorii care influenţează eliberarea proteinelor sarcoplasmatice la destrămarea biostructurii, am urmărit: natura şi durata de acţiune a factorului ce produce destrămarea biostructurii, prezenţa soluţiei interstiţiale.

Din datele prezentate în tabela 1, se observă că deşi concentraţia sucurilor mixte are valori apropiate (12,6%, 10,2% sau 11,8%) pentru cazurile de omorîre studiate, cantităţile de proteine ce se eliberează prin

aceste sucuri variază foarte mult; astfel raportul (cantitatea de proteine în sucul mixt)/(cantitatea de proteine în sucul interstiţial) are valoarea 5,1 pentru omorîrea prin congelare cu zăpadă carbonică, 4,1 pentru omorîre prin păstrare 24 ore la —10° şi 3,0 pentru omorîre prin păstrare 24 ore la +4°.

În cazul omorîrii biostructurii în absenţa soluţiei interstiţiale, rezultatele sînt mult mai omogene — tabela 2; sucurile plasmatice obţinute de la probe omorîte în moduri diferite nu prezintă variaţii marcante în ceea ce priveşte cantitatea totală de proteine pe care le conţin. Rezultă

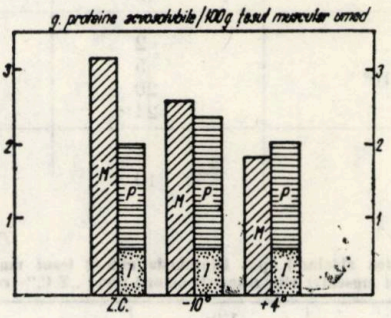


Fig. 7. — Comparaţie între cantitatea de proteine acvosolubile din sucul mixt şi suma cantităţilor de proteine acvosolubile din sucurile interstiţial şi plasmatic; probele omorîte prin: „Z.C." — congelare cu zăpadă carbonică, „—10°"—păstrare 24 ore la —10°, „+4°" — păstrare 24 ore la temperatura de +4°.

deci că la destrămarea biostructurii în absenţa soluţiei interstiţiale cantitatea de proteine sarcoplasmatice acvosolubile eliberate nu depinde de modul de omorîre.

De altfel, în cazul omorîrii ţesutului prin congelare cu zăpadă carbonică sau prin păstrare la —10°, în prezenţa soluţiei interstiţiale are loc o eliberare mai importantă de proteine acvosolubile (suc mixt) din biostructură decît în absenţa ei (suma dintre sucul interstiţial şi sucul plasmatic) (figura 7). Se poate deci afirma că, la destrămarea biostructurii, prezenţa soluţiei interstiţiale nu are un efect protector, ci dimpotrivă conduce la o eliberare mărită de proteine.

În sfîrşit, cantitatea de proteine sarcoplasmatice acvosolubile eliberate prin destrămarea biostructurii este, ca şi în cazul altor componente biostructurale investigate (apă, ioni) (1—3) direct proporţională cu timpul de acţiune a factorului care produce destrămarea (tabela 3).

Pentru a completa datele despre proteinele sarcoplasmatice acvosolubile din biostructura ţesutului muscular striat, ne-am propus să determinăm şi repartiţia între biostructură şi apa liberă tisulară a D fructozo-1,6-difosfat D gliceraldehid-3 fosfatliazei.

Conform concepţiei biostructurale, biochimismul ce are loc în apa liberă tisulară este controlat de biostructură, una din căile de control fiind integrarea sau eliberarea din biostructură a enzimelor participante la acest biochimism. Ca urmare este de aşteptat ca cel puţin o parte din aldolaza celulară să se găsească sub formă integrată în biostructură.

În tabela 4 sînt prezentate activităţile acestei enzime în sucurile interstiţial, plasmatic şi mixt. Se observă că în sucurile mixte, activitatea enzimei este mai mare decît în sucurile interstiţiale; de asemenea, o activitate însemnată a acestei enzime apare şi în sucurile plasmatice. Este deci

Tabela 3

Concentrația (în g%) și cantitatea de proteine acvosolubile (în g proteine în sucul provenit de la 100g țesut umed) în sucurile mixte, în cazul păstrării țesutului muscular striat la temperaturile de −10°, +4° și +24°.

Temperatură de păstrare (°C)	Timp de păstrare (ore)	Volum suc din 100 g țesut (ml)	Concentrația proteinelor suc (g%)	Cantitatea proteinelor în 100 g țesut. (g)
+4°	2	7,8	6,1	0,48
	5	13,0	6,0	0,78
	20	15,4	11,8	1,83
	48	15,1	14,7	2,27
−10°	2	11,0	7,0	0,79
	5	15,6	8,0	1,24
	20	21,7	11,2	2,44
	24	25,2	10,5	2,61
	1	10,5	8,8	0,93
	10	19,1	17,8	3,25

Tabela 4

Activitatea aldolazei (μM triozofosfat/min./g țesut muscular/38°) în sucurile interstițial, plasmatic și mixt, stoarse din țesut muscular viu, respectiv omorît prin: „Z.C." — congelare cu zăpadă carbonică; „−10°" — păstrare 24 ore la −10°.

Nr.	Viu	Z.C.		−10°	
	suc interstițial	suc plasmatic.	suc mixt	suc plasmatic	suc mixt
1	78,8	38,7	181,8	66,6	132,0
2	88,0	41,0	217,0	64,5	138,0
3	82,5	37,6	200,2	63,2	128,1
media	83,1	39,9	199,6	64,6	132,7
activit.enz.s.mixt / activit.enzim.s.interstițial			2,4		1,6

evident că aldolaza se găsește în țesutul muscular striat atît dizolvată în apa liberă tisulară cît și integrată în biostructură. Cum însă activitatea enzimei în sucul interstițial este mai mare decît în sucul plasmatic — ca de altfel și diferența „activitate enzimatică în sucul mixt — activitate enzimatică în sucul plasmatic" — rezultă că majoritatea enzimei active se află în apa liberă tisulară. Totuși, se observă că eliberarea enzimei din biostructură depinde de modul de omorîre al protoplasmei: raportul „(activitate enzimatică în sucul mixt)/ (activitate enzimatică în sucul interstițial)" este de 2,4 pentru cazul omorîrii țesutului prin congelare cu zăpadă carbonică și numai 1,6 pentru cazul omorîrii prin depozitare timp de 24 ore la −10°.

CONCLUZII

Din rezultatele obținute se evidențiază următoarele concluzii:

1) Proteinele sarcoplasmatice acvosolubile sînt parțial dizolvate în apa liberă tisulară și parțial integrate în biostructura țesutului muscular striat.

2) Între proteinele din apa liberă și din biostructură există diferențe atît de ordin calitativ cît și de ordin cantitativ; în soluția interstițială

numărul speciilor de proteine este mult mai mare ca cel existent în biostructură.

3) Majoritatea activității aldolazei se găsește în stare solvită în apa liberă tisulară și numai o parte este integrată în biostructură.

4) Cantitatea de proteine și de aldolază eliberate prin destrămarea biostructurii depinde de modul de omorîre a țesutului. Destrămarea biostructurii în prezența soluției interstițiale conduce la eliberarea unei cantități mai mari de proteine în raport cu destrămarea în abesența acestei soluții.

Predată la redacție la 20 august 1976

Facultatea de farmacie, disciplina de biochimie, Institutul de medicină și farmacie — București

SARCOPLASMIC AQUEOUS SOLUBLE PROTEINS IN THE BIOSTRUCTURE OF THE STRIATED RABBIT MUSCLE

SUMMARY

The sarcoplasmic aqueous soluble proteins of the striated muscles are studied from the biostructure conception point of view. Their quantitative and qualitative distribution between the biostructure and the tissue free water as well as the factors influencing the proteins release, when the biostructure breaks down, are presented. The distribution of the D-fructose — 1,6-diphosphate D-glyceraldehide — 3 phosphateliase between the biostructure and the tissue free water is also analysed.

BIBLIOGRAFIE

1. Olguța Macovski, *Rev. Roum. Biochim.*, **I**, 201 (1970).
2. Olguța Macovschi, *Studii și cerc. biochimie*, **14**, 289 (1971).
3. Olguța Macovschi, *Rev. Roum. Biochimie*, **10**, 35 (1973).
4. M. Șerban, Dita Cotariu, *Biochimia contracției musculare*, Ed. Acad. R.S.R., București 1970.
5. E. Macovschi, *Biostructura*, Ed. Acad. R.S.R., București, 1969.
6. E. Macovschi, *Natura și structura materiei vii*, Ed. Acad. R.S.R., București 1971.
7. V. Gheție, V.Micușan, *Analiza imunochimică*, Ed. Acad. R.S.R., București, 1966.
8. M. Șerban, D. Tănăsescu, *Studii și cerc. biocim.*, **6**, 595, (1963).
9. D. J. Hartshorne, S. V. Perry, *Biochemical J.*, **85**, 171 (1962).
10. J. A. Sibley, A. L. Lehninger, *J. Biol. Chem.*, **177**, 859, (1949).

ST. CERC. BIOCHIM. 19, 2, 165–169 (1976)

UNELE ASPECTE PRIVIND COMPORTAREA BIOSTRUCTURII ȚESUTULUI MUSCULAR STRIAT ÎN TIMPUL PĂSTRĂRII LA DIFERITE TEMPERATURI

OLGUȚA MACOVSCHI

Rezumat. — Se prezintă rezultate privind eliberarea unor componente biostructurale importante ca: apă, ioni de potasiu și sodiu, proteine, din biostructura țesutului muscular striat în urma omorîrii acestuia prin păstrare la diferite temperaturi. În cursul păstrării, viteza procesului de destrămare nu este constantă. În toate cazurile investigate, se distinge o perioadă de timp caracterizată printr-o viteză de destrămare mică, corespunzătoare unui echilibru temporar între biostructură și noile condiții de mediu; durata acestei perioade variază în funcție de temperatura de păstrare.

În lucrări anterioare (1—3) s-a arătat că destrămarea biostructurii țesutului muscular striat depinde de condițiile în care acesta se găsește în momentul morții, de starea biostructurii în timpul destrămării sale. Astfel, datele experimentale au demonstrat că natura agentului ce produce destrămarea, timpul său de acțiune precum și prezența soluției interstițiale sînt principalii factori care influențează cantitatea componentelor eliberate din biostructura în curs de destrămare.

În scopul aprofundării acestor concluzii am încercat să punem în evidență eventualele diferențe existente între modul de destrămare al biostructurii țesutului muscular, sub influența unor factori foarte apropiați ca natură și mod de acțiune asupra materiei vii. Pentru a realiza scopul propus am cercetat eliberarea cîtorva dintre principalele componente biostructurale — apă, ioni de potasiu și sodiu, proteine în urma omorîrii protoplasmei prin păstrarea țesutului muscular, la temperaturi diferite.

Ca metodă de investigare a biostructurii am ales metoda stoarcerii, metoda folosită și în investigarea biostructurii țesuturilor vegetale (4,5) și a cărei aplicabilitate în cercetarea biostructurii țesutului muscular striat a fost verificată anterior (6).

MATERIALE ȘI METODE

În determinările experimentale s-au folosit probe de 45 — 50 g mușchi striați albi din coapsă de iepure, animalul fiind omorît prin exsanguinare și apoi traheotomie.

Țesutul muscular a fost folosit în stare vie și omorît. Omorîrea s-a realizat prin depozitare pentru diferite intervale de timp, la temperaturi de −10°, +4°, +24° și 70° a probelor de mușchi.

Pentru obținerea sucurilor interstițial și mixt, probele de mușchi vii respectiv omorîți, au fost comprimate la 25 at timp de 30 minute, folosind o presă manuală de laborator prevăzută cu un reductor pentru canti-

tăţi mici de material. Pentru obţinerea sucului plasmatic, reziduul rămas după îndepărtarea sucului interstiţial a fost omorît şi apoi stors din nou 30 minute la 25 at.

După măsurarea volumului, sucurile au fost folosite pentru dozarea proteinelor prin metoda biuretului şi pentru dozarea ionilor de potasiu şi sodiu prin fotometrie în flacără, după îndepărtarea în prealabil a proteinelor prin precipitarea lor cu acid tricloracetic 6%.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Din tabela 1 se observă diferenţe mici în ceea ce priveşte cantitatea de apă, ioni şi proteine din sucurile mixte, ca funcţie de temperatura de păstrare a ţesutului, valori mult diferite înregistrîndu-se doar în cazul omorîrii prin păstrare timp de 4 ore la + 70°.

Tabela 1

Cantităţile de apă, ioni de potasiu şi sodiu şi proteine în sucul mixt stors din ţesutul muscular omorît prin: păstrare timp de 24 ore la temperaturile de −10°, +4°, +24° şi timp de 4 ore la +70°.

Mod de omorîre	Volum suc mixt (ml/100 g ţesut umed)	K^+ (μM/g. ţesut umed)	Na^+ (μM/g. ţesut umed)	Proteine acvosolubile (g. prot./100 g ţesut)
−10°	12,2	67	16	2,61
+4°	12,2	60	15	2,27
+24°	11,1	71	11	—
+70°	22,2	123	31	—

Această constatare poate fi explicată dacă ţinem seama de faptul că în toate celelalte cazuri de omorîre (cu excepţia păstării la +70° cînd are loc coagularea proteinelor) principalii factori care determină destrămarea biostructurii sînt practic aceeaşi şi anume: întreruperea circulaţiei sîngelui şi declanşarea diverselor procese biochimice în soluţia interstiţială — altele decît în mod obişnuit — şi care diferă de la o temperatură la alta numai în ceea ce priveşte viteza de reacţie.

Datele experimentale prezentate în figurile 1—4, privind influenţa timpului de păstrare la temperaturile studiate, asupra procesului de destrămare a biostructurii, arată că atît volumul sucului mixt cît şi cantitatea ionilor de sodiu şi potasiu şi de proteine acvosolubile sînt cu atît mai mari cu cît timpul de păstrare este mai mare.

În acelaşi timp, pentru componentele investigate, se constată o scădere semnificativă a vitezei de eliberare din biostructură după primele ore de păstrare. Scăderea vitezei de destrămare este, în unele cazuri, suficient de importantă pentru ca volumul apei şi cantităţile ionilor eliberaţi din biostructură să rămînă practic constante sau să crească foarte puţin pentru o anumită perioadă de timp.

Din punctul de vedere al concepţiei biostructurale, aceste constatări se pot explica printr-o destrămare importantă a biostructurii în primele ore de păstrare drept răspuns la modificarea condiţiilor ei de existenţă care acum sînt diferite de cele normale. Apoi procesul se opreşte sau în orice caz este foarte mult încetinit, deoarece între biostructura parţial

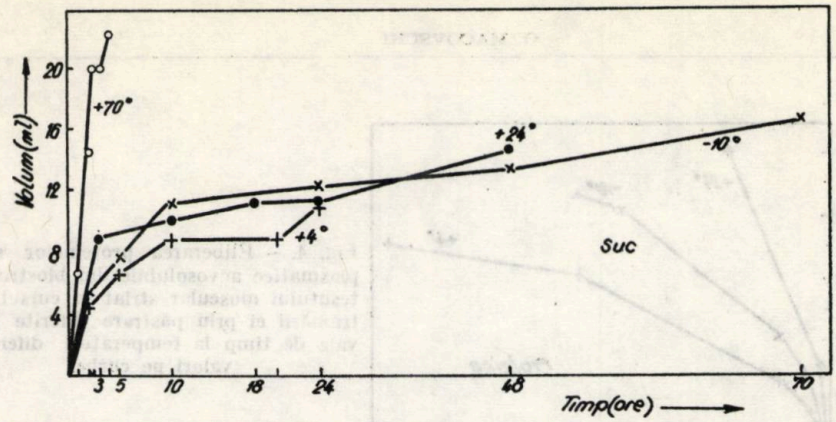


Fig. 1. — Eliberarea apei din biostructura țesutului muscular striat în cursul destrămării ei prin păstrare diferite intervale de timp la temperaturi diferite — valori pe curbe.

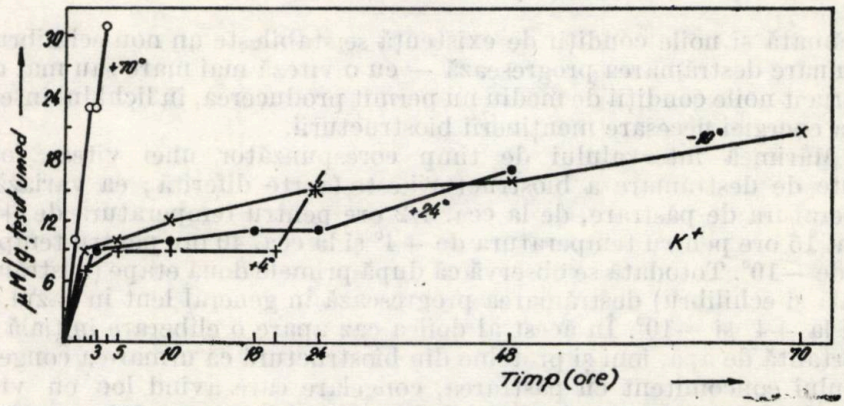


Fig. 2. — Eliberarea ionilor de potasiu din biostructura țesutului muscular striat în cursul destrămării ei prin păstrare diferite intervale de timp la diferite temperaturi— valori pe curbe.

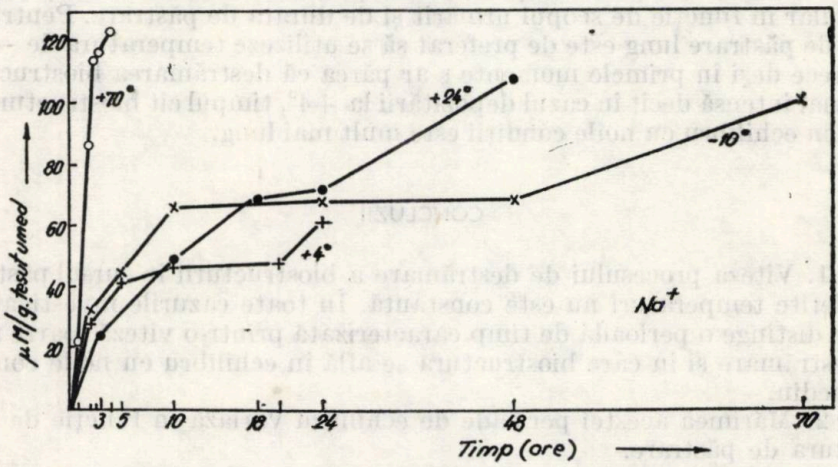


Fig. 3. — Eliberarea ionilor de sodiu din biostructura țesutului muscular striat în cursul destrămării ei prin păstrare diferite intervale de timp la temperaturi diferite — valori pe curbe

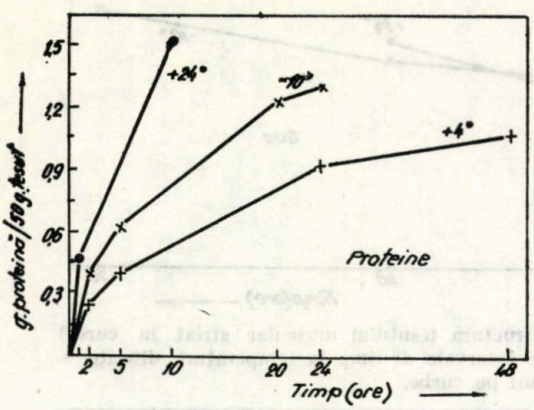


Fig. 4. — Eliberarea proteinelor sarcoplasmatice acvosolubile din biostructura țesutului muscular striat în cursul destrămării ei prin păstrare diferite intervale de timp la temperaturi diferite — valori pe curbe.

destrămată și noile condiții de existență se stabilește un nou echilibru. În continuare destrămarea progresează — cu o viteză mai mare sau mai mică —întrucît noile condiții de mediu nu permit producerea, în lichidul interstițial, a energiei necesare menținerii biostructurii.

Mărimea intervalului de timp corespunzător unei viteze foarte scăzute de destrămare a biostructurii este foarte diferită; ea variază cu temperatura de păstrare, de la cca. 1/2 ore pentru temperatura de +70°, la cca. 15 ore pentru temperatura de +4° și la cca. 40 ore pentru temperatura de —10°. Totodată se observă că după primele două etape (destrămare inițială și echilibru) destrămarea progresează în general lent în cazul păstrării la +4° și —10°. În acest al doilea caz apare o eliberare inițială mai importantă de apă, ioni și proteine din biostructură ca urmare a congelării țesutului concomitent cu păstrarea, congelare care avînd loc cu viteză mică, alterează în parte și structura histochimică a țesutului.

Aceste constatări sugerează unele aplicații practice și anume: ele dau posibilitatea alegerii temperaturii de păstrare a biostructurii țesutului muscular în funcție de scopul urmărit și de durata de păstrare. Pentru un timp de păstrare lung este de preferat să se utilizeze temperatura de — 10° deoarece deși în primele momente s-ar părea că destrămarea biostructurii este mai intensă decît în cazul depozitării la +4°, timpul cît biostructura rămîne în echilibru cu noile condiții este mult mai lung.

CONCLUZII

1. Viteza procesului de destrămare a biostructurii în cursul păstrării la diferite temperaturi nu este constantă. În toate cazurile investigate se poate distinge o perioadă de timp caracterizată printr-o viteză foarte mică de destrămare și în care biostructura se află în echilibru cu noile condiții de mediu.

2. Mărimea acestei perioade de echilibru variază în funcție de temperatura de păstrare.

Predată la redacție la 20 august 1976

Facultatea de farmacie, disciplina de biochimie, Institutul de medicină și farmacie — București

STUDIES ON THE BIOSTRUCTURE BEHAVIOUR OF THE STRIATED MUSCLE DURING ITS STORAGE AT DIFFERENT TEMPERATURES

SUMMARY

Results are presented, concerning the release from the striated muscle biostructure of some important components as water, potassium and sodium ions as well as proteins when the tissue is killed by storage at different temperatures. During the storage the rate of the breakdown process is not constant. For all the investigated cases a time-period, of very low breakdown rate, can be observed, which corresponds to a temporary equilibrium between the biostructure and the new surrounding conditions; the amplitude of this period is function of the storage temperature.

BIBLIOGRAFIE

1. Olguța Macovschi, Rev. Roumaine Biochim., **7**, 201 (1970).
2. Olguța Macovschi, Studii și Cerc. Biochimie, **14**, 289 (1971).
3. Olguța Macovschi, Rev. Roumaine Biochim., **10**, 35 (1973).
4. E. Macovschi, *Biostructura*, Ed. Acad. R.S.R., București, 1969.
5. E. Macovschi, *Natura și structura materiei vii*, Ed. Acad. R.S.R., București, 1971.
6. Olguța Macovschi și M. E. Macovschi, *Biochemistry and experim. Biology* — sub tipar.

ST. CERC. BIOCHIM. 19 2, 171—174 (1976)

ACUMULAREA AMINOACIZILOR ÎN MEDIUL DE CULTURĂ AL UNOR BACTERII

LIDIA POPA

Rezumat. S-a studiat acumularea aminoacizilor în mediul de cultură al unor bacterii sporulate și nesporulate. S-a constatat că aminoacizii care predomină sînt : glicina, acidul glutamic, alanina și valina. Tulpinile cele mai bune producătoare de valină sînt : *Proteus vulgaris I.C.C.F.*, *B. subtilis 2589* și *B. mycoides 601*. La *B. subtilis 2589* și *B. mycoides 601*, ceilalți aminoacizi, formați în mediu pe lîngă valină, sînt în cantitate foarte mică, ceea ce prezintă un avantaj față de *Proteus vulgaris I.C.C.F.*, la care, pe lîngă valină, se acumulează în mediu și o cantitate mare de alanină.

Necesitatea în aminoacizi se pune în special, pentru mărirea valorii nutritive a alimentelor vegetale, care constituie baza alimentară a numeroase popoare și care, sînt mai sărace în aminoacizi esențiali.

Obținerea aminoacizilor prin hidroliza proteinelor vegetale și animale este neeconomică, deoarece necesită o cantitate imensă de materie primă alimentară. Obținerea prin sinteză chimică este de asemenea, complicată și costisitoare și în plus, se obțin preparate racemice, care nu pot fi folosite în scopuri biologice. Producția microbiană de aminoacizi are în schimb, un avantaj precis asupra sintezei chimice, deoarece pe această cale, se obțin aminoacizi aparținînd exclusiv formei biologic active L (4). Cercetările asupra biosintezei microbiene a aminoacizilor au arătat că, majoritatea microorganismelor acumulează în mediul de cultură, mai ales la sfîrșitul perioadei exponențiale de creștere, mici cantități de aminoacizi (3), (4). Dintre bacterii, producători mai activi sînt micrococii, sarcina și unii bacili nesporulați (3).

În lucrarea de față, prezentăm rezultatele obținute privind acumularea aminoacizilor în mediul de cultură al unor bacterii sporulate și nesporulate, mai puțin studiate din acest punct de vedere.

MATERIAL ȘI METODĂ

Au fost luate în studiu următoarele culturi bacteriene, aparținînd colecției laboratorului de Microbiologie :

— bacterii nesporulate : *Proteus vulgaris I. C. C. F.*, *Sarcina lutea I. C. C. F.* și *Sarcina lutea L. M. F.*

—bacterii sporulate : *Bacillus cereus 3009*, *Bacillus cereus L. M. F.*, *Bacillus megaterium 5117*, *Bacillus mycoides 601*, *Bacillus subtilis 2589* și *Bacillus subtilis Oxford I. C. C. F.* Ca medii de cultură s-au folosit :

— geloză nutritivă, pentru conservarea culturilor microbiene (5);

— mediul de experiență, pentru producerea de aminoacizi (7), de compoziția următoare : glucoză-10 g; NH_4Cl—1 g; KH_2PO_4 — 0,1 g; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$—0,05 g; extract de drojdie—0,08 g; $CaCO_3$—3,4g; apă

de robinet — 100 ml. Repartizare în pahare Erlenmayer de 100 ml., cîte 15 ml şi sterilizare la 115°C, 30'. Glucoza şi $CaCO_3$ se sterilizează separat şi se adaugă în mod steril mediului, în cantitatea corespunzătoare;

— mediul de inoculum (6), de compoziţia următoare: glucoză 2 g; NH_4Cl — 0,2 g; KH_2PO_4 — 0,1 g; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ — 0,05 g; extract de drojdie — 0,04 g; apă de robinet — 100 ml; pH = 7,0. Repartizare în pahare Erlenmayer de 100 ml, cîte 15 ml şi sterilizare la 115°C, 20'. Însămînţarea pentru experienţă s-a făcut cu 4% inoculum de 42 h. Atît inoculumul, cît şi experienţa au fost incubate la 29°C, sub agitare, la vibroterm. Durata experienţei: 6 zile.

La sfîrşitul experienţei, s-au făcut examene microscopice şi s-a determinat pH-ul. Mediile au fost apoi centrifugate la 4000 r/min, 30' şi în supernatant s-a determinat zahărul rămas neconsumat, după metoda SCHORL (9) şi aminoacizii, calitativ şi cantitativ, prin cromatografie pe hîrtie. Pentru determinarea cromatografică a aminoacizilor, 10 ml supernatant limpede s-a trecut pe coloană de DOWEX-50, sau ZEROLIT-3RC. Dacă supernatantul e tulbure, se deproteinizează în prealabil cu CH_3—COOH — 0,04 N (2) şi apoi se trece pe coloană. Eluare cu NH_3 — 5%, evaporare pe bae de apă şi reluare cu 1 ml alcool izopropilic 10%. Aplicarea s-a făcut pe hîrtie Whatman nr. 1, cîte 0,015 ml din fiecare probă. Aceeaşi cantitate s-a aplicat din soluţii 0,1% de aminoacizi puri, care pot apare în mediul de cultură şi care au servit ca martori. Irigare cu butanol-acid acetic-apă 4 :1 :5 o dată şi 40 :15 :5 de două ori (1). Uscare la temperatura camerei şi developare prin stropire cu ninhidrină 0,5 g % în acetonă, care conţine 1 g % acid acetic glacial. Încălzire, după evaporarea acetonei, în etuvă la 65°C, 30' (8). Pentru determinare cantitativă, se lasă cromatograma la întuneric, 24 h. Se decupează apoi petele, se taie în fîşii subţiri, care se introduc într-o eprubetă, unde se adaugă 4 ml metanol, care conţine 0,005 g % $(NO_3)_2Cu$. Se astupă eprubeta, se agită şi se lasă 1 1/2 — 2 h pentru extragere. În acelaşi timp, se taie din cromatogramă porţiuni necolorate, care se prelucrează la fel, servind ca martor. Se colorimetrează la 530 nm (1). Rezultatele sînt exprimate în mg. aminoacizi la 1 ml mediu, prin convertirea extincţiei citite la colorimetru, în mg. aminoacizi, pe baza curbelor etalon stabilite în prealabil, pentru fiecare aminoacid în parte.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

La examenul microscopic, s-a constatat o dezvoltare normală pentru majoritatea culturilor, excepţie făcînd *Sarcina lutea I. C. C. F.*, care s-a dezvoltat foarte slab. Cel mai mare consum de zahăr din mediu (tabela 1) l-au realizat culturile: *Proteus vulgaris I. C. C. F.*, *B. cereus 3009*, *B. megaterium 5117*, *B. mycoides 601*, *B. subtilis 2589* şi *B. subtilis Oxford I.C.C.F.*

În ceea ce priveşte aminoacizii formaţi (fig. 1,2 şi 3), s-a constatat că predomină glicina, acidul glutamic, alanina şi valina. Alanina apare la toate tulpinile studiate şi în cantitate mare. Valina apare în special la: *Proteus vulgaris I.C.C.F.*, *B. mycoides 601* şi *B. subtilis 2589*.

Rezultatele obţinute la determinarea cantitativă a aminoacizilor (tabela 2) arată că, în general, tulpinile bacteriene care au consumat mult zahăr, au format şi o cantitate mare de aminoacizi. Aşa este cazul la: *Proteus vulgaris I. C. C. F.*, *B. cereus 3009*, *B. mycoides 601*, *B. subtilis*

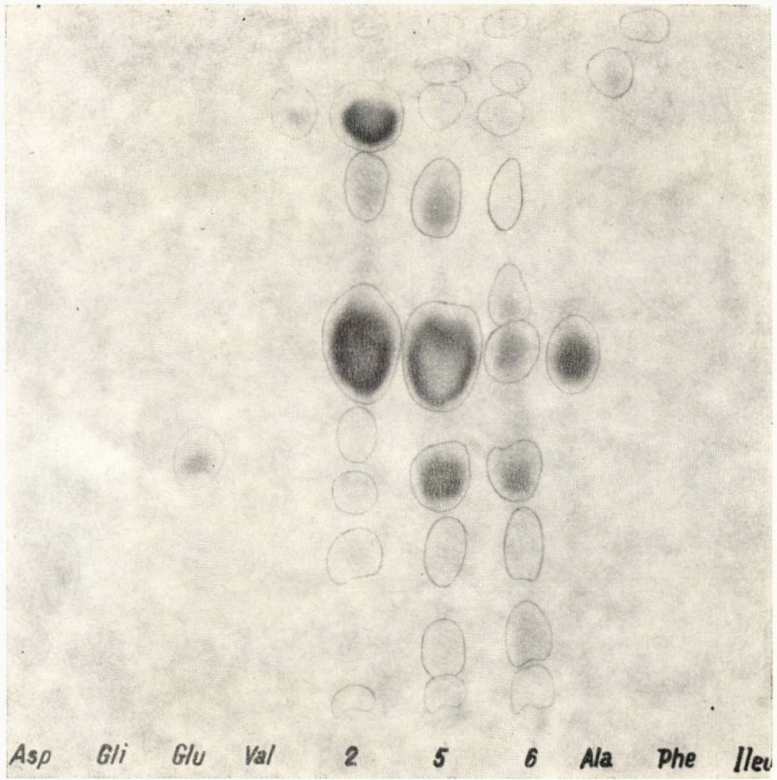


Fig. 1. — Cromatograma aminoacizilor din mediul de cultură al unor bacterii.

Legenda: 2 = Proteus vulgaris I.C.C.F.; 5 = B. cereus 3009 6 = B. cereus L.M.F.; Asp., Gli, Glu, Val, Ala, Phe, Ileu = martori.

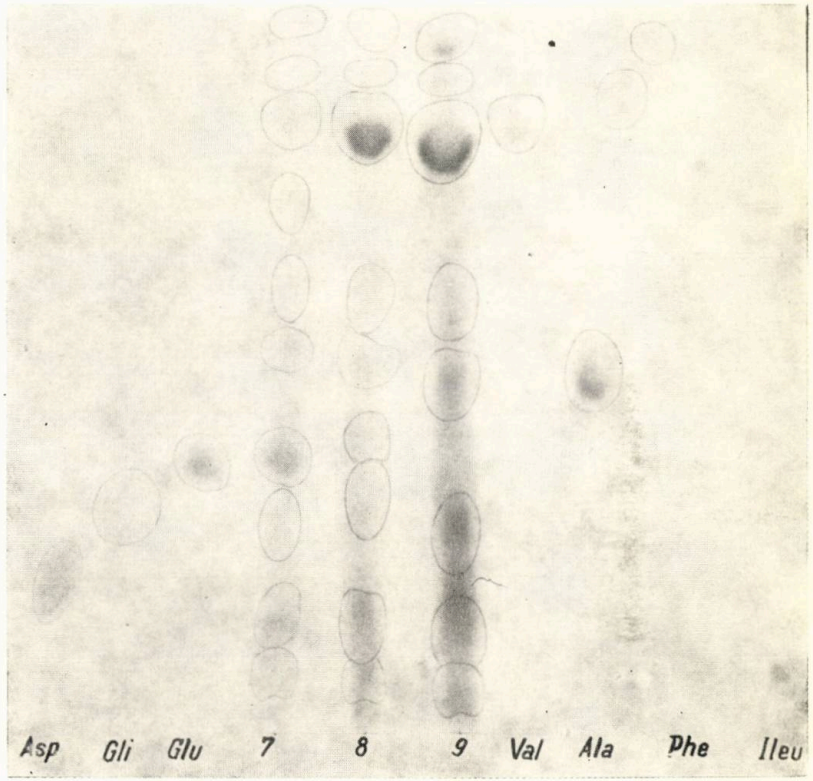


Fig. 2. — Cromatograma aminoacizilor din mediul de cultură al unor bacterii.

Legendă: 7 = B. megaterium 5117; 8 = B. mycoides 601; 9 = B. subtilis 2589; Asp, Gli, Glu, Val, Ala, Phe, Ileu = martori.

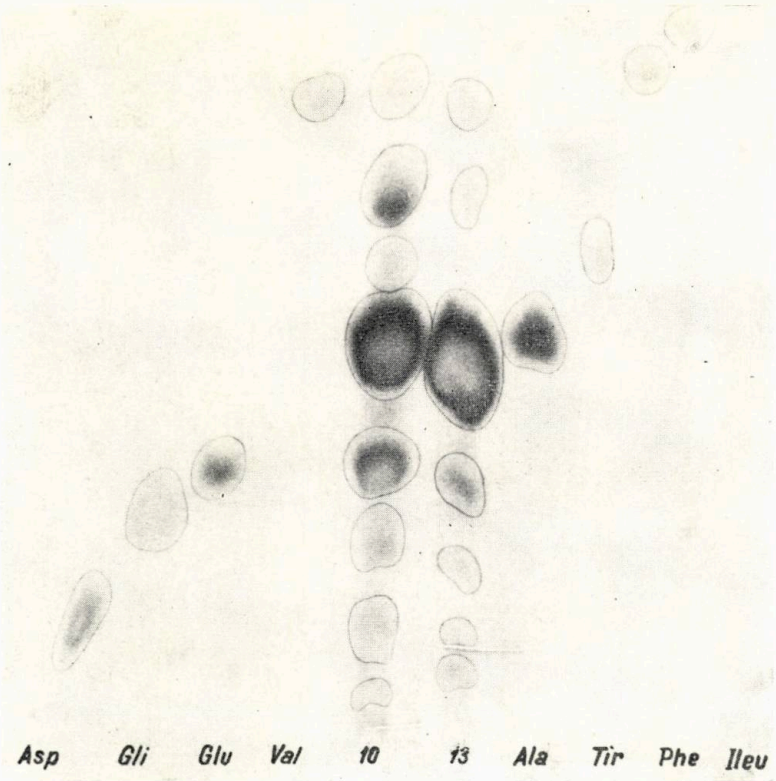


Fig. 3. — Cromatograma aminoacizilor din mediul de cultură al unor bacterii.

Legendă: *10* = B. subtilis Oxford I.C.C.F.; *13* = Sarcina lutea L.M.F.; Asp, Gli, Glu, Val, Ala, Tir, Phe, Ileu = martori.

Tabela 1

Utilizarea zahărului din mediu

Specia bacteriană	Glucoză consumată — g/100 ml mediu
Proteus vulgaris I.C.C.F.	6,150
Sarcina lutea L.M.F.	3,400
Sarcina lutea I.C.C.F.	0
Bacillus cereus 3009	8,087
Bacillus cereus L.M.F.	2,962
Bacillus megaterium 5117	8,559
Bacillus mycoides 601	7,680
Bacillus subtilis 2589	6,685
Bacillus subtilis Oxford ICCF	7,488

Tabela 2

Cantitatea de aminoacizi acumulaţi n mediul de cultură

Specia bacteriană	Aminoacizi — mg/1 ml.			Total aminoacizi determinaţi mg/1ml
	Glu	Ala	Val	
Proteus vulgaris ICCF	—	70,0	51,0	121,0
Sarcina lutea L.M.F.	6,3	167,7	7,0	181,0
Bacillus cereus 3009	5,0	43,0	—	48,0
Bacillus cereus L.M.F.	2,3	7,7	4,7	14,7
Bacillus megaterium 5117	4,3	3,7	5,7	13,7
Bacillus mycoides 601	6,3	5,0	28,7	40,0
Bacillus subtilis 2589	4,6	3,3	71,7	79,6
Bacillus subtilis Oxford I.C.C.F.	13,3	123,7	5,3	142,3

2589 şi *B. subtilis Oxford ICCF*. Există însă şi excepţii. Astfel, *B. megaterium 5117*, care a consumat mult zahăr, nu a format şi o cantitate mare de aminoacizi. În schimb, *Sarcina lutea L. M. F.*, care a consumat puţin zahăr, a format o cantitate mare de aminoacizi. Se observă că, tulpini bune producătoare de valină sînt : *Proteus vulgaris I. C. C. F.*, *B. mycoides 601* şi *B. subtilis 2589* ; tulpini bune producătoare de alanină sînt : *Proteus vulgaris I. C. C. F.*, *Sarcina lutea L. M. F.*, *B. cereus 3009* şi *B. subtilis Oxford I. C. C. F.*

Întrucît interesează în special valina, ca fiind aminoacid esenţial, se constată că cea mai bună tulpină din acest punct de vedere este *B. subtilis 2589*, nu numai prin cantitatea mare de valină obţinută, ci şi prin faptul, că ceilalţi aminoacizi formaţi pe lîngă valină — acidul glutamic şi alanina — sînt în cantitate foarte mică. Acelaşi lucru se poate spune şi despre *B. mycoides 601*, deşi aici cantitatea de valină obţinută este mai mică. Cît priveşte *Proteus vulgaris I. C. C. F.*, deşi formează o cantitate mare de valină, formează în schimb şi o cantitate foarte mare de alanină. De aceea, sînt de preferat tulpini ca : *B. subtilis 2589* şi *B. mycoides 601*,

care produc pe lîngă valină cantităţi mici din ceilalţi aminoacizi şi la care, se poate mări cantitatea de valină produsă, prin modificarea condiţiilor de mediu.

CONCLUZII

1. Aminoacizii care predomină în mediul de cultură al bacteriilor testate sînt: glicina, acidul glutamic, alanina şi valina, aceştia doi din urmă, în cantitate destul de mare.

2. Tulpinile cele mai bune producătoare de valină sînt: *Proteus vulgaris I. C. C. F.*, *B. subtilis 2589* şi *B. mycoides 601.*

3. La *B. subtilis 2589* şi *B. mycoides 601* predomină în mediu valina, ceilalţi aminoacizi fiind în cantitate foarte mică, ceea ce prezintă un avantaj, faţă de *Proteus vulgaris I. C. C. F.*, la care pe lîngă valină, se formează şi o cantitate mare de alanină.

Prezentat la redacţie 9 iulie 1976

Catedra de biologie vegetală, genetică şi microbiologie, Laboratorul de microbiologice. Facultatea de Biologie-Bucureşti

ACCUMULATION DES AMINO-ACIDES DANS LE MILIEU DE CULTURE DE CERTAINES BACTÉRIES

(RÉSUMÉ)

On a étudié l'accumulation des amino-acides dans le milieu de culture de certaines bactéries sporulées et non sporulées. On a constaté, que les amino-acides qui prédominent dans le milieu de culture des bactéries testées sont: la glycine, l'acide glutamique, l'alanine et la valine. Les souches meilleures productrices de valine sont: *B. subtilis 2589*, *B. mycoides 601* et *Proteus vulgaris I. C. C. F.* Au cas de *B. subtilis 2589* et *B. mycoides 601*, c'est la valine qui prédomine dans le milieu de culture, les autres amino-acides formés — l'acide glutamique et l'alanine — étant en très petite quantité, ce qui présente un avantage sur *Proteus vulgaris I. C. C. F.*, qui près de valine, accumule aussi une grande quantité d'alanine.

BIBLIOGRAFIE

1. N. A. Golovkin, O. S. Şagan, A. A. Vsiliev, E. M. Miltina, Prikl. biohim. i mikrobiol., *3*, 184 (1967).
2. I. M. Hais, K. Macek, *Paper Chromatography*, third edition; Publishing house of the Czechoslovak Academy of Sciences, Prague, 1963, p. 437.
3. S. Kinoshita, Adv. in Appl. Microbiol., *1*, 201, (1959).
4. N. A. Krasilnicov, Usp. sovrem. biol., *52*, 149, (1961).
5. L. Mesrobeanu, A. Marx, D. Stavri, G. Teodorescu, *Mediile de cultură în bacteriologia medicală*, Editura medicală, Bucureşti, p. 92, 1961.
6. V. N. Şapoşnicov, T. B. Kazanskaia, I. G. Orlova, Dokl. Akad. Nauk S.S.S.R., *159*, 1408, (1964).
7. I. Vucetici, T. B. Kazanskaia, I. S. Vostrov, Mikrobiologhiia, *39*, 434, (1970).
8. G. N. Zaiţeva, A. N. Belozerski, Mikrobiologhiia, *26*, 533, (1957)
9. * * * *Manualul Chimistului*, vol. II, Editura AGIR, Bucureşti, 1948, p. 1842.

ST. CERC. BIOCHIM. 19, 2, 175—181 (1976)

DINAMICA FRACȚIUNILOR LIPIDICE LA MIDIE, ÎN CICLUL EI BIOLOGIC ANUAL

NATALIA S. ROȘOIU

Rezumat. Au fost studiate variațiile lunare de lipide totale, acizi grași totali, acizi grași liberi, acid oleic, glicerol, gliceride și de fracție insaponifiabilă la *Mytilus galloprovincialis* Lmk., în cursul anului 1974.
Observațiile lunare au scos în evidență, un caracter dinamic pronunțat, în strînsă dependență de ciclul biologic anual al midiei. Cantitățile maxime de lipide totale, acizi grași totali și liberi, glicerol și gliceride coincid cu perioada de intensă activitate a gonadelor și de maturare sexuală a lor. S-au urmărit valorile lunare ale indicilor de aciditate, saponificare și esterificare a lipidelor totale, și cele ale indicelui de saponificare al acizilor grași totali și al indicelui de iod. S-a găsit că indicele de iod este maxim în lunile aprilie-mai.
Greutățile moleculare medii ale gliceridelor neutre și greutățile moleculare medii ale acizilor grași totali arată că midia conține și acizi grași superiori, cu lanț lung de atomi de carbon în moleculă.

Valoarea nutritivă ridicată a resurselor biologice marine, precum și potențialul lor de compuși bioactivi, ce reprezintă sursa de substanțe farmacodinamic active pentru terapeutica viitorului, justifică importanța deosebită care se acordă studiului lor biochimic. Unul dintre grupele de organisme marine cele mai frecvent studiate este cel al moluștelor bivalve. Astfel, o serie de lucrări (1—3) arată că la bivalva *Mytilus galloprovincialis* din alte ape decît cele românești, lipidele totale reprezintă 7,5—17% din substanța uscată. La această specie provitaminele D, sterolii, colesterolul, fosfolipidele (2,4—6) și acizii grași nesaturați, îndeosebi acizii arahidonic și linolenic (4), au valori ridicate. Studiul nu poate fi considerat ca încheiat, dacă avem în vedere datele obținute la alte specii ale familiei Mytilidae (7—11) și modificările sezoniere, dependente de activitatea sexuală a midiei, de ciclul ei biologic anual (2, 5, 12—14).

La litoralul românesc al Mării Negre, în ultimii ani au fost inițiate primele cercetări asupra fracțiunilor lipidice din nevertebratele marine. Ne-am propus pentru început, să elucidăm variațiile fracțiunilor lipidice survenite în cursul ciclului biologic anual al midiei (specie de masă valorificabilă la litoralul românesc). În condițiile noastre hidrobiologice, ciclul sexual al midiei este axat pe două faze esențiale : faza de repaos și faza de reproducere (15), iar durata lui variază considerabil în funcție de latitudine (16). La midia din Marea Neagră există cinci perioade funcționale importante în ciclul ei sexual : (*a*) repaos sexual, (*b*) gametogeneză, (*c*) maturare a gonadelor, (*d*) depunerea pontei și (*e*) repaos sexual temporar între două depuneri. În lunile ianuarie—mai are loc gametogeneza, iar depunerea pontei se produce, în genere, în mai—iunie, în funcție de diverși factori ecologici; în iulie urmează faza de repaos sexual temporar. În perioada august—octombrie are loc o nouă fază de reproducere, iar în următoarele luni, noiembrie—decembrie, activitatea gonadelor este minimă (17).

MATERIAL ȘI METODE

Au fost analizate midiile de stîncă, de mărime mijlocie (4—5 cm lungime), recoltate de la Agigea, în perioada decembrie 1973— noiembrie 1974. Determinările s-au efectuat la jumătatea fiecărei luni, iar în luna august pe datele de 8 și 28, datorită unui fenomen biologic mai rar întîlnit, și anume, „înflorirea" apei produsă de o algă unicelulară.

Țesutul obținut de la cca. 1 000 exemplare de midii prin separarea de cochilie, a fost uscat la 70° C pînă la greutate constantă, mojarat fin și cîntărit. Pulberea uscată a fost extrasă cu dicloretan, în aparatul Soxhlet. După evaporarea completă a dicloretanului, extractul lipidic a fost uscat timp de o oră la 70°C (9, 18). La lipidele totale, astfel obținute s-au determinat indicii de aciditate, de saponificare și de esterificare.

Acizii grași au fost separați de fracția insaponifiabilă prin saponificare pe baie de apă la reflux, cu soluție alcoolică de KOH 0,5 N, timp de 30 minute. Soluția rece de săpun s-a trecut cantitativ cu alcool etilic 50 % într-o pîlnie de separare și s-a extras fracția insaponificabilă cu eter de petrol. Extractul eteric a fost supus apoi evaporării și uscării timp de o oră la 60°C. După îndepărtarea fracției insaponificabile, soluțiile alcoolice de săpun și apele de spălare au fost reunite, s-a evaporat apoi complet alcoolul, iar descompunerea săpunului s-a făcut cu HCl conc. După răcire, acizii grași s-au extras într-o pîlnie de separare cu eter etilic anhidru. Extractele eterice reunite au fost spălate cu NaCl 10 % pînă la reacție neutră. Acizii grași au fost obținuți, în final, prin evaporarea completă a eterului, uscare la 60°C într-o capsulă tarată și cîntărire. La acizii grași totali s-au determinat indicii de saponificare și de iod (metoda Hanus). Determinările ulterioare s-au efectuat conform metodelor clasice (9, 18).

Greutățile moleculare medii ale gliceridelor neutre și greutățile moleculare medii ale acizilor grași totali s-au obținut prin calcul.

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Rezultatele obținute ne permit să corelăm variațiile cantitative lunare ale fracțiunilor lipidice, cu fazele corespunzătoare ale ciclului sexual la midie. Datele noastre concordă cu cele cunoscute din literatură (1—3) referitoare la alte specii ale familiei Mytilidae, din alte mări, însă datorită condițiilor ecologice diferite, constatăm unele mici deosebiri cantitative în raport cu datele altor autori.

Lipidele totale. Conținutul în lipide totale variază, de la o lună la alta, între 9,49 și 14,85% din substanța uscată (fig. 1). Cele mai mici valori s-au înregistrat în cursul lunilor ianuarie—februarie, iar cele maxime în lunile aprilie—mai. Explicăm conținutul mare de lipide constatat primăvara prin pregătirea organismului, din punct de vedere energetic, pentru reproducere (15—17).

Acizii grași totali sînt fracțiunea cea mai importantă a lipidelor (52,85—85,88%) și reprezintă între 6,55 și 12,75% din s. u., avînd aceleași perioade de maxim și minim ca lipidele totale (fig. 1). Procentele maxime din faza de maturitate sexuală a gonadelor (aprilie—mai) scad după emisia produselor sexuale. În cursul lunilor iulie — decembrie au loc creșteri

ușoare. În lunile august-septembrie s-a semnalat o scădere a cantităților de acizi grași totali, fapt care a coincis cu „înflorirea" apei, produsă de înmulțirea explozivă a algei microfite *Exuviaella cordata*, la litoralul românesc al Mării Negre.

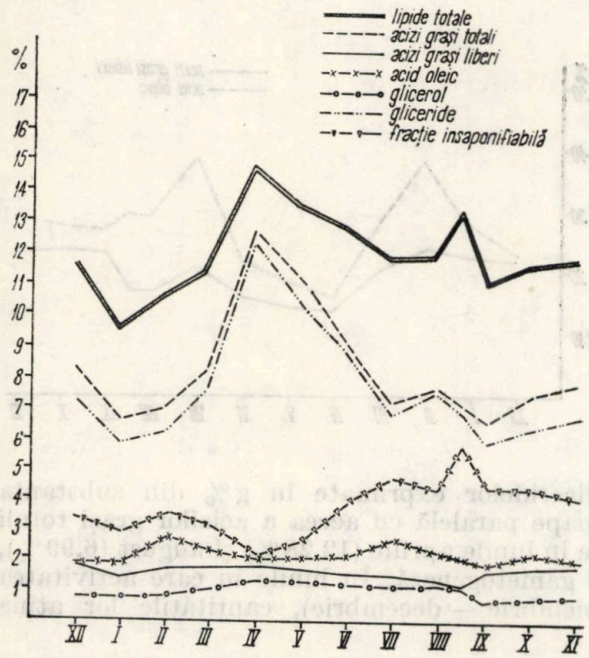


Fig. 1.—Dinamica lunară a fracțiunilor lipidice la *Mytilus galloprovincialis* (în g % din substanța uscată).

Acizii grași liberi prezintă variații lunare mult mai slabe decît ale celorlalte fracțiuni lipidice (exceptînd glicerolul). Primul maxim se constată în luna aprilie (1,76 % din s. u.), după care urmează o scădere ușor gradată la prima decadă a lunii august. În ultima decadă a acestei luni se produce o scădere ceva mai accentuată, în urma căreia acizii grași liberi ating valoarea minimă (1,18% din s. u.). De la sfîrșitul lunii august și pînă în decembrie, curba capătă un aspect ușor ascendent (fig. 1). Valorile maxime se înregistrează în anotimpul rece cînd are loc refacerea structurală a gonadelor. În fazele de intensă activitate gametogenetică și de maturitate sexuală, cantitatea acestor acizi scade. Un fenomen similar a fost observat de LUBET și colaboratorii (12) la specia *Mytilus edulis*. —

Valorile procentuale ale acizilor grași liberi din acizii grași totali oscilează în limite destul de largi, și anume între 23,69 % (luna februarie) și 13,76 % (luna aprilie), conform figurii 2.

Acidul oleic prezintă două maxime net distincte, situate în lunile februarie (2,71 %) și iulie (2.66 %), precum și un palier pentru lunile aprilie — iunie (2,00 — 2,05 % din s. u.) (fig. 1). Din figura 2 remarcăm că valorile procentuale exprimate la acizii grași totali sînt maxime tot în lunile februarie (38,74%) și iulie (37,20 %), repetîndu-se aceeași curbă ușor ascendentă între lunile aprilie — iunie.

Glicerolul prezintă variații ceva mai moderate. Cantitățile maxime se constată în perioadele călduroase ale anului. În luna aprilie ca și la celelalte fracțiuni lipidice, glicerolul atinge în cantitate, valoarea maximă (1,29 % din s. u.), care se menține la același nivel și în luna următoare. În septembrie imediat după „înflorirea" apei, se produce o scădere bruscă (fig. 1).

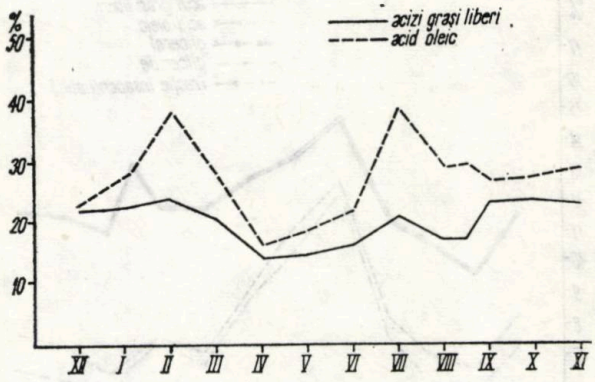


Fig. 2. — Dinamica lunară a acizilor grași liberi și a acidului oleic (în g % din acizii grași totali).

Gliceridele. Valorile gliceridelor exprimate în g% din substanța uscată, descriu o curbă aproape paralelă cu aceea a acizilor grași totali (fig. 1), cu maxime simultane în lunile aprilie (12,28 %) și august (6,99 %), și valori ridicate în faza de gametogeneză. În lunile în care activitatea gonadelor este minimă (noiembrie — decembrie), cantitățile lor ating valori relativ mici.

Fracția insaponifiabilă are o valoare minimă în luna aprilie (2,10 % din s. u.) și maxime în cursul lunilor iunie—septembrie (cu 6,30 % în august), scăzînd apoi spre începutul iernii (fig. 1).

Tabela 1 prezintă valorile indicilor ce caracterizează lipidele totale și acizii grași, precum și greutățile moleculare medii ale gliceridelor neutre și ale acizilor grași totali, după cum urmează :

Indicele de aciditate are valoarea medie de 34,6 mg KOH și variază între 26,0—42,0 mg KOH. Valorile minime se constată în lunile aprilie—mai, iar maxime în lunile februarie și iulie.

Indicele de saponificare al lipidelor totale variază între 139,1 și 218,0 mg KOH, avînd valoarea medie de 178,0 mg KOH. Valorile minime se constată în lunile de toamnă și iarnă, iar maxime în lunile iulie — august.

Indicele de saponificare al acizilor grași totali are valori cuprinse între 203,4 și 338,1 mg KOH. Minimele se înregistrează în lunile octombrie—decembrie și aprilie — mai, iar maximele în lunile iulie — august.

Indicele de esterificare al lipidelor totale, oscilează între 106,7 și 181,0 mg KOH. Valorile minime se constată în perioada octombrie —decembrie, iar maxima în luna august.

Indicele de iod are valoarea medie de 91,2 g I_2/100 g acizi grași, atinge valoarea maximă în aprilie, descrește ușor în mai și iunie și ajunge la valoarea sa minimă în decembrie.

Tabela 1

Valorile lunare ale indicilor ce caracterizează lipidele totale şi acizii graşi şi greutăţile moleculare medii ale gliceridelor neutre şi acizilor graşi totali.

Luna	*Indice de aciditate* (mg KOH)	*Indice de saponificare a lipidelor totale* (mg KOH)	*Indice de saponificare a acizilor graşi* (mg KOH)	*Indice de esterificare* (mg KOH)	*Indice de iod* (g I_2/100g acizi graşi)	*Greutatea moleculară medie a gliceridelor neutre*	*Greutatea moleculară medie a acizilor graşi totali*
1973 : XII	31,8	148,7	203,4	116,9	66,7	377,7	275,8
1974 : I	38,7	173,9	250,0	135,3	—	322,6	224.4
II	42,8	182,4	271,1	139,5	67,9	307,7	207,0
III	39,9	196,4	269,8	156,5	—	285,7	208,0
IV	26,0	185,2	220,0	159,2	126,2	303,0	255,1
V	29,5	202,6	246,9	173,1	113,3	277,0	227,3
IV	31,4	188,7	265,9	157,3	91,3	297,3	211,0
VII	42,4	204,0	355,0	161,6	—	275,1	167,5
8-VIII	37,0	218,0	338,1	181,0	—	257,4	166,0
26-VIII	30,6	184,5	345,0	153,9	88,0	304,1	162,6
IX	32,3	139,1	230,5	106,8	84,6	403,4	243,4
X	33,6	143,3	227,4	109,7	—	391,7	246,8
XI	34,1	147,4	224,0	113,4	—	380,7	250,5
Media :	34,6	178,0	263,6	143,4	91,2	321,8	218,9

Greutatea moleculară medie (G_{MM}) *a gliceridelor neutre și greutatea moleculară medie a acizilor grași totali.* În medie, gliceridele neutre au G_{MM} 321,8 iar acizii grași totali au G_{MM} 218,9. Valorile greutăților moleculare medii ale gliceridelor neutre oscilează între 257,4 și 403,4, prezentînd maxi-

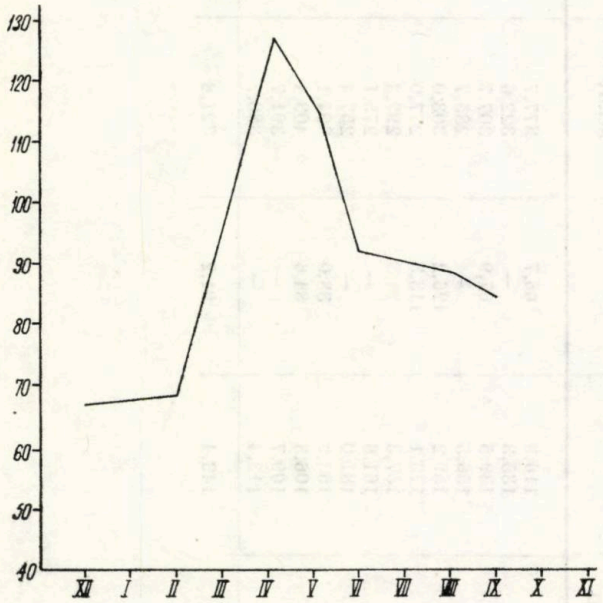


Fig. 3 — Dinamica lunară a indicelui de iod al acizilor grași totali la *Mytilus galloprovincialis* (exprimat în g I_2/100 g acizi grași).

me în lunile septembrie — decembrie și minime în lunile călduroase ale anului. Greutățile moleculare medii ale acizilor grași totali oscilează între 162, 6 și 275,8 și au de asemenea, valori minime în lunile de toamnă și iarnă.

CONCLUZII

1. Fracțiunile lipidice analizate, prezintă un caracter dinamic pronunțat în strînsă dependență de ciclul biologic anual al midiei. Cantitățile maxime de lipide totale, aicizi grași totali și acizi grași liberi, glicerol și gliceride, coincid cu perioada de intensă activitate gametogenetică și de maturare sexuală a gonadelor.

2. Gradul de nesaturare maxim al acizilor grași (atestat de către indicele de iod), se constată în lunile aprilie — mai, în plină perioadă de reproducere din ciclul sexual al midiei.

3. Greutățile moleculare medii ale gliceridelor neutre și greutățile moleculare medii ale acizilor grași totali, arată că midia conține și acizi grași superiori cu lanț lung de atomi de carbon în moleculă.

Prezentat la redacție la 25 martie 1975

Institutul Român de Cercetări Marine — Constanța

THE DYNAMICS OF LIPIDIC FRACTIONS FROM MUSSEL, DURING ITS ANNUAL BIOLOGICAL CYCLE

SUMMARY

The present investigations aimed at ascertaining whether the total lipids, free- and total fatty acids, the oleic acid, the glycerol, glycerides and the nonsaponifiable fractions vary monthly in the *Mytilus galloprovincialis* Lmk. tissue extracts during year 1974. It has turned out that the lipidic fractions have any conspicuous dynamic features strongly dependent on the annual biological cycle of the mollusca. This result has suggested that the total lipid content, the free- and total fatty acid content, as well as the content of glycerol and glycerides reach an extremely high level until the time of full sexual maturation of bivalve gonads. Our table also shows the monthly established acidity value, the esterification and saponification values of total lipids, the saponification value of total fatty acids, and, of course, the iodine value. In the case of latter an increased degree of unsaturation of fatty acids occur in April and May. In the following we have also investigated the mean molecular weight of neutral glycerids and the mean molecular weight of total fatty acids, demonstrating that between them some superior long-chain molecules of carbon atoms occur as fatty acidic components.

BIBLIOGRAFIE

1. Z. A. Abliamitova-Vinogradoova, Trudî Karadag. Biol. St., **7**, 30 (1949).
2. J. M. Gastaud, R. Huguet, M. Solère, Rapp. comm. int. Mer. Médit, **21**, 243 (1972).
3. I. A. Stepaniuk, *Biohimia morskih organismov*, Ed. Naukova Dumka, Kiev, 101 (1967).
4. G. S. Korobkina, A. N. Danilova, N. N. Kalinina, T. A. Leonova, Rîbn. Hoz., **12**, 57 (1965).
5. A. Strusi, Boll. Pesca. Piscicolt. Idrobiol., **19**, 199 (1964).
6. Z. A. Vinogradova, R. P. Kandiuk, *Biochimia morskih organismov*, Ed. Naukova Dumka, 61, 1967.
7. W. R. Bannatyne, J. Thomas, N. Z. J. Sci., **12**, 207 (1969).
8. D. Gardner, J. P. Rilley, J. Mar. Biol. Ass. U.K., **52**, 827 (1972).
9. A. Kaplan, I. L. Chaikoff, J. Biol. Chem., **108**, 201 (1935).
10. W. Rodegker, J. C. Nevenzel, Comp. Biochem. Physiol., **11**, 53 (1964).
11. Y. Toyama, T. Tanaka, Mem. Fac. Eng., Nagoya Univ., **8**, 29 (1956).
12. P. Lubet, D. Le Feron De Longcamp, C. R. Soc. Biol., **163**, 110, (1969).
13. M. Maningand, C. Sany, P. Monnieur, M. Arnavielhe-Bony, M. Durand, C. R. Soc. Biol., **157**, 2244 (1963).
14. C. Williams, J. Mar. Biol. Ass. U. K., **49**, 161 (1969).
15. P. Lubet, Mem. Inst. Sc. Tech. Peches mar., **23**, 396 (1959).
16. P. Lubet, C. Broucart, C. R. Soc. Biol., **157**, 1996 (1963).
17. G. Dimoftache, A. Telembici, Recherches marines, 181 (1972).
18. F. W. Lorenz, C. Entenman, I. L. Chaikoff, J. Biol. Chem., **123**, 527, (1938).

ST. CERC. BIOCHIM. 19, 2, 183–188 (1976)

ÎMBUNĂTĂȚIREA PIGMENTAȚIEI ȘI A VALORII BIOLOGICE A GĂLBENUȘULUI DE OU PRIN SUPLIMENTAREA HRANEI GĂINILOR CU FĂINĂ DE GOGOȘARI ROȘII ȘI POLEN DE PORUMB

GH. SĂLĂJAN și V. TĂMAȘ

Rezumat. — Făina de gogoșari singură sau în asociație cu polenul de porumb, administrată ca adaos în hrana găinilor, intensifică pigmentația și ridică conținutul în carotinoide al gălbenușului de ou. Cele mai bune rezultate se obțin cu doza de 0,2% făină de gogoșari.

Cercetările anterioare au arătat că îmbunătățirea pigmentației și a valorii biologice a gălbenușului de ou se poate realiza prin includerea în hrana găinilor a unor furaje bogate în carotinoide sau a pigmenților sintetici (1) — (5).

În această lucrare sînt prezentate rezultatele privind efectul adaosului făinii de gogoșari roșii și a amestecului acesteia cu polen de porumb, asupra pigmentației și a valorii biologice a gălbenușului de ou.

Tabela 1

Structura furajelor combinate și adaosurile utilizate în experiențe

Structura furajului (%)	Experiența I			Experiența a II-a		
	Lot 1 (M)	Lot 2	Lot 3	Lot 1 (M)	Lot 2	Lot 3
Orz	67,00	67,00	67,00	6,00	6,00	6,00
Porumb	—	—	—	57,00	57,00	57,00
Sroturi de soia	12,00	12,00	12,00	—	—	—
Sroturi de floarea soarelui	—	—	—	17,50	17,50	17,50
Tărițe de grîu	—	—	—	8,00	8,00	8,00
Drojdie de bere	—	—	—	1,00	1,00	1,00
Făină de lucernă	3,00	3,00	3,00	—	—	—
Făină de carne	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
Făină de pește	—	—	—	0,50	0,50	0,50
Lapte praf	—	—	—	1,00	1,00	1,00
Cretă furajeră	8,25	8,25	8,25	5,00	5,00	5,00
Fosforar	—	—	—	1,47	1,47	1,47
Sare de bucătărie	0,25	0,25	0,25	0,50	0,50	0,50
Avimin	—	—	—	0,03	0,03	0,03
BOCM–3	7,50	7,50	7,50	—	—	—
Total	100,00	10,00	100,00	100,00	100,00	100,00
Energie netă, kcal/kg	1 850	1 850	1 850	1 995	1 995	1 995
Proteină brută (%)	17,20	17,20	17,20	17,79	17,79	17,79
Adaos suplimentar:						
— Făină de gogoșari roșii	—	0,20	0,30	—	0,40	0,40
— Polen de porumb	—	—	—	—	2,00	4,00

MATERIAL ȘI METODĂ

Făina de gogoșari s-a obținut prin uscare artificială și măcinare, iar polenul prin uscarea și treerarea paniculelor de porumb. S-a lucrat pe găini *Starcross*, în două serii de experiențe, fiecare a cîte 3 loturi, luîndu-se cîte 7 găini de lot. Furajele combinate utilizate în hrană, cît și schema experiențelor, sînt date în tabela 1.

Extracția, identificarea și dozarea carotinoidelor s-au făcut după metodele consacrate (6) — (13).

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Făina de gogoșari și polenul de porumb sînt produse bogate în carotinoide, îndeosebi în β-carotină, luteină și zeaxantină, iar făina de gogoșari și în ceto-carotinoide, cum sînt capsantina și capsorubina (tabela 2).

Tabela 2

Conținutul în carotinoide al polenului de porumb și al făinii de gogoșari roșii (mg/kg material)

Pigmenții	Polen de porumb	Făină de gogoșari
β-Carotină	3,98	29,30
Criptoxantină	0,78	2,63
Luteină	36,00	0,50
Zeaxantină	16,20	10,50
Capsantină	—	60,50
Capsorubină	—	11,00
Total	38,96	114,43

Deși diferențele între loturi în privința greutății corporale inițiale și finale și a intensității ouatului nu sînt semnificative (tabela 3), datorită greutății medii superioare a ouălor se poate aprecia că cele mai bune rezultate s-au obținut la loturile 2, îndeosebi la lotul 2 din experiența I, care a primit ca adaos la hrană doza de 0,2 % făină de gogoșari roșii.

Furajul combinat utilizat în experiența I (în care ponderea majoră a revenit orzului) a fost mai sărac în carotinoide în comparație cu cel utilizat în experiența a II-a (în care ponderea majoră a revenit porumbului). Din aceste motive și conținutul de carotinoide acumulate în gălbenuș a fost mai mare în cazul experienței a II-a decît în cazul experienței I (tabela 4).

Deosebit de important este faptul că, față de lotul *M*, la loturile 2 și 3 conținutul în carotinoide al gălbenușului a crescut de circa 4 ori în experiența I și de două ori în experiența a II-a. Grupînd carotinoidele din gălbenuș după natura și rolul lor biochimic (tabela 5), se constată valori absolute mai mari pentru carotinoidele fără rol provitaminic și mai mici pentru cele cu rol de provitamină A.

În comparație cu loturile *M*, la loturile 2 și 3 din experiențele I și a II-a conținutul în carotinoide cu rol provitaminic a crescut de circa

Tabela 3

Variația greutății medii corporale și a producției de ouă

Specificare	Lotul 1 (M)	Lotul 2	Lotul 3
	Experiența I		
Greutatea medie corporală (g):			
— inițială	1840,00±95,41	1781,96±101,24	1860,00±115,58
— finală	1873,33±104,14	1708,57±99,67	1822,86±110,67
Intensitatea ouatului,(%)	33,25	35,71	27,68
Greutatea medie a ouălor, (g)	57,99±0,06	59,81±0,05++[1])	58,34±0,08
	Experiența a II-a		
Greutatea medie corporală, (g):			
— inițială	1718,33±105,80	1855,00±76,80	1880,70±106,30
— finală	1716,60±126,18	1858,50±179,00	1764,20±61,50
Intensitatea ouatului, (%)	35,27	35,62	35,60
Greutatea medie a ouălor, (g)	60,42±0,10	+ 60,85±0,07	60,42±0,04

1) + = $p < 0,05$
++ = $p < 0,01$

Tabela 4

Conținutul în carotinoide al furajelor (F) și al gălbenușului ouălor (G) (mg/kg material)

Pigmenții	Lotul 1 (M)		Lotul 2		Lotul 3	
	F	G	F	G	F	G
	Experiența I					
β-Carotină	0,98	0,19	1,04	2,60	1,06	2,80
Criptoxantină	urme	urme	0,01	0,01	0,01	0,01
Luteină	1,62	6,12	1,62	17,60	1,62	18,00
Zeaxantină	0,42	2,65	0,44	13,55	0,45	13,90
Capsantină	—	—	0,12	1,20	0,18	2,20
Capsorubină	—	—	0,02	0,10	0,03	0,15
Total	3,02	8,96	3,25	35,15	3,35	37,15
	Experiența a II-a					
β-Carotină	2,86	1,20	2,98	2,40	3,00	2,50
Criptoxantină	1,00	0,95	1,00	0,95	1,00	1,00
Luteină	13,80	15,00	14,18	22,05	27,00	23,00
Zeaxantină	10,90	9,00	14,22	16,65	17,05	18,05
Capsantină	—	—	0,24	1,30	0,23	2,70
Capsorubină	—	—	0,04	0,12	0,04	0,25
Total	28,56	26,15	32,66	43,47	48,32	47,50

Tabela 5

Conţinutul gălbenuşului în carotinoide cu (A) şi fără rol provitaminic (B) şi cu rol deosebit în pigmentare (C)
(în mg/kg)

Grupa de carotinoide	Experienţa I			Experienţa a II-a		
	Lot 1 (M)	Lot 2	Lot 3	Lot (M)	Lot 2	Lot 3
A β-Carotină Criptoxantină	0,19	2,70	2,90	1,30	3,35	3,50
B Luteină Zeaxantină Capsantină Capsorubină	8,77	32,45	34,25	24,00	40,22	44,50
C β-Caroitnă Criptoxantină Zeaxantină Capsantină Capsorubină	2,84	17,55	19,15	10,30	21,42	24,50

14 ori respectiv de 3 ori, cel cu rol deosebit în pigmentare de circa 6 ori, respectiv de 2 ori, iar cel fără rol provitaminic de circa 4 ori, respectiv de 1,6 ori.

Din aceste date rezultă că adaosul de făină de gogoşari roşii, singură sau în asociaţie cu polenul de porumb, la furaje, în dozele arătate, contribuie la îmbogăţirea gălbenuşului în primul rînd în carotinoide cu rol de provitamină A, precum şi în carotinoide cu rol deosebit în pigmentare. Rezultatele cele mai bune s-au obţinut prin administrarea dozei de 0,2 % făină de gogoşari roşii cînd pe lîngă îmbunătăţirea valorii biologice şi a gradului de pigmentare a gălbenuşului (graţie şi capsorubinei care este o cetonă cu un sistem cromofor deosebit de bogat) se poate realiza şi o eficienţă economică mai ridicată datorată dozei minime de aditivi cu pigmenţi.

Tabela 6

Raportul dintre grupele A, B şi C de carotinoide, culoarea şi nota acordată gălbenuşurilor ouălor

Lotul	Raportul A/B/C (A = 1)	Culoarea gălbenuşurilor	Nota [1]
	Experienţa I		
1(M)	1/46,16/14,95	galben-pal	0
2	1/12,02/6,50	portocaliu	4
3	1/11,81/6,60	portocaliu intens	5
	Experienţa a II-a		
1(M)	1/18,46/7,92	galben	0—1
2	1/12,01/6,39	portocaliu	4
3	1/12,71/7,00	portocaliu intens	5

0 = galben pal; 1 = galben; 2 = galben intens;
3 = galben oranj; 4 = portocaliu; 5 portocaliu intens.

Pigmentarea gălbenușului este în funcție nu numai de conținutul total de carotinoide, ci și de natura acestora, respectiv de raportul dintre carotinoidele cu rol de provitamină A și cele cu rol deosebit în pigmentare. Din acest punct de vedere loturile 2 și 3 de la ambele experiențe prezintă un raport favorabil grupei de carotinoide cu rol în pigmentație, ceea ce este în concordanță cu notele acordate culorii gălbenușului (tabela 6).

CONCLUZII

1. Polenul de porumb și făina de gogoșari constituie surse deosebit de bogate în carotinoide, iar utilizarea lor duce la intensificarea gradului de pigmentare și la ridicarea valorii biologice a gălbenușului de ou.

2. Dintre cele două surse de carotinoide studiate în prezenta lucrare, mai bună s-a dovedit făina de gogoșari roșii administrată în doză de 0,2 % în hrana găinilor, care asigură creșterea conținutului în carotinoide a gălbenușului, îmbunătățirea valorii biologice și imprimarea unei culori portocalii mult solicitate de consumatori.

3. Rezultate bune s-au obținut și prin asocierea polenului cu făina de gogoșari în proporție de 2 % și respectiv 0,4 %.

4. Se recomandă aplicarea în producție a făinii de gogoșari și a polenului de porumb, îndeosebi în cazul folosirii furajelor combinate din care lipsește porumbul.

Prezentat la redacție
23 decembrie 1974

Disciplina de alimentația animalelor domestice și disciplina de biochimie Institutul agronomic Cluj

IMPROVEMEMT OF THE PIGMENTATION AND BIOLOGICAL VALUE OF THE EGG YOLK BY SUPPLEMENTING THE DIET OF LAYING HENS WITH SWEETBELL REDPEPPER MEAL AND CORN POLLEN

SUMMARY

The meal of sweetbell redpepper (*Caspicum annuum varietas rotundum*) either pure or associated with corn pollen, when added into the laying hens diet, intensified the pigmentation and enriched the carotenoids content of the egg yolk.

The best results were obtained when the sweetbell redpepper meal was fed as 0.2 % of the diet.

BIBLIOGRAFIE

1. E. Makay, G. J. Mountney, E. C. Naber, *Poultry Sci.*, **42**, 32 (1963).
2. V. Tămaș, Gh. Sălăjan, C. Bodea, *St. cerc. biochim.*, **13**, 123 (1970).
3. Ir. Wildfeur, Gordian, **69**, 436 (1970).
4. W. L. Marusich, *News and Reviews*, F. Hoffman-La Roche, Inc., Netley, N. J., 1970.

5. Gh. Săläjan, Teză de doctorat, Institutul agronomic „Ion Ionescu de la Brad", Iaşi, 1972.
6. * * * Association of Official Agricultural Chemists Official Methods of Analysis, Washington, D. G., 1960.
7. J. L. Faisson, N. Arpin, Bull. Soc. chim. Biol., **49**, 535 (1967).
8. M. L. Scott, I. Ascarelli, G. Obson, *Poultry Sci.*, **47**, 863 (1968).
9. J. L. Faisson, B. J. Hullet, R. E. Devies, J. R. Couch, *Poultry Sci.*, **40**, 227 (1969).
10. J. L. Faisson, N. Arpin, Ph. Libreton, Chimie Analytique, **51**, 227 (1969).
11. V. Tămaş, C. Bodea, Rev. roum. Chim., **15**, 655 (1970).
12. T. W. Goodwin, In „Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments", Academic Press, London — New York, 1965, p. 529.
13. F. C. Czygan, Arch. Mikrobiol., **61**, 81 (1968).

ST. CERC. BIOCHIM., 19, 2, 189—194 (1976)

EFECTUL IONULUI FOSFAT ŞI AL CREATINEI ASUPRA NIVELULUI FOSFOCREATINEI DIN MUŞCHIUL GASTROCNEMIAN DE BROASCĂ

LORA SCOLNIC

Rezumat. — Administrarea la broaşte şi respectiv adaosul de fosfat sau fosfat + creatină la soluţia fiziologică în care este imersat un muşchi normal sau excitat, măresc conţinutul în fosfocreatină al muşchiului.
Se arată că efectul stimulator al componentelor fosfocreatinei asupra biosintezei acesteia este mascat cînd muşchii sînt stimulaţi în condiţii brutale.

Este astăzi admis că energia necesară pentru activitatea musculară rezultă direct sau indirect din desfacerea ATP-ului şi indirect din desfacerea fosfocreatinei, precum şi că acest proces se efectuează cu eliberare de fosfat anorganic.

Se ştie de asemenea că fosfocreatina degradată în cursul contracţiei musculare este resintetizată imediat după relaxare (1) (2).

O serie de autori au demonstrat creşterea nivelului fosfocreatinei şi după administrarea de fosfaţi (3) sau imersarea muşchilor tetanizaţi în soluţii suplimentate cu fosfaţi (4) sau fosfaţi + creatină (5).

Pe de altă parte, Medeşan (6), introducînd muşchi gastrocnemieni de broască în soluţii fiziologice ce conţin fosfat sau fosfat + creatină, nu înregistrează un surplus de fosfocreatină.

Într-o lucrare anterioară (7) am arătat că aplicînd muşchiului gastrocnemian de broască, excitaţii puternice şi de lungă durată, valorile fosfatului anorganic exosmozat care, conform paralelismului stabilit în mai multe cazuri (8—10), reflectă pe cele conţinute în muşchi şi indirect ale fosfocreatinei, nu revin la normal timp îndelungat, pe cînd ale muşchiului excitat cu un curent electric slab şi de scurtă durată, revin imediat la normal.

Dat fiind că autorul menţionat (6) foloseşte stimuli electrici de intensitate şi durată de aplicare mare, ne-am pus problema dacă efectul ionului fosfat, ca şi al creatinei, nu este mascat de condiţiile brutale în care s-a produs stimularea.

De asemenea, în experienţele efectuate pe muşchi în repaos se compară rezultatele obţinute pe muşchii imersaţi cu cele ale muşchiului neimersat în soluţii fiziologice. Datele din literatură (11) arată că imersarea muşchiului în soluţii fiziologice scade considerabil conţinutul său în fosfocreatină.

Pe de altă parte, ionul fosfat conduce la mărirea în volum a ţesutului (12—14), fapt omis în evaluarea rezultatelor (6).

De aceea ne-am propus să reluăm investigaţiile, aplicînd stimuli electrici care să nu altereze muşchiul (7), iar evaluarea rezultatelor să o facem în condiţii comparabile.

MATERIAL ŞI METODE

Cercetările au fost efectuate într-o primă serie de experienţe pe muşchi gastrocnemieni de broaşte (Rana ridibunda), normali şi excitaţi in situ, imersaţi în soluţii fiziologice care conţineau fosfat sau fosfat + creatină.

În a doua serie de experienţe, pe muşchi proveniţi de la broaşte cărora li s-a administrat soluţii de fosfat + creatină.

În prima serie de experienţe, după amputarea simultană a picioarelor posterioare, muşchii gastrocnemieni au fost izolaţi atent în vederea evitării traumatismului, tamponaţi uşor pe hîrtie de filtru şi cîntăriţi la balanţa de torsiune.

La martor, muşchii au fost imersaţi în 10 ml soluţie salină preparată după Jendrassick (15), conţinînd la litru 6,5 gr NaCl, 0,2 gr KCl, 0,2 gr $CaCl_2$ şi 0,1 gr $NaHCO_3$.

Pentru urmărirea efectului ionului fosfat sau fosfat + creatină, s-au luat 9 părţi dintr-o soluţie M/15 Na_2HPO_4 + 0,5 părţi soluţie M/15 KH_2PO_4 şi s-a adus cu soluţie Ringer-Jendrassick la 100 ml. Cînd se adăuga şi creatina, se foloseau 5 părţi soluţie de creatină M/15 + 5 părţi soluţie tampon fosfaţi (ca mai sus) care se aduc la 100 ml cu soluţie Ringer-Jendrassick.

După 1 sau 3 ore de la introducerea muşchiului în soluţia fiziologică, la temperatura camerei, în condiţii de oxigenare, acesta se scotea, se ştergea uşor pe hîrtie de filtru, se cîntărea şi se fixa în hidroxid de sodiu, după metoda Jendrassick şi Faiszt (15) cu modificarea adusă de noi (16). Fosfocreatina se doza după Alexeeva (17).

În altă variantă experimentală muşchii erau excitaţi în situ după metoda Macovschi şi col. (18), cu aceeaşi intensitate de curent. După excitare se amputau rapid simultan ambele picioare, se izolau concomitent în minimum de timp posibil ambii muşchi, martorul introducîndu-se în soluţie Ringer-Jendrassick, iar muşchiul pereche în soluţie Ringer suplimentată cu fosfaţi sau fosfaţi + creatină.

În a doua serie de experienţe, pentru a urmări pe aceeaşi broască influenţa exercitată de componentele fosfocreatinei, am recurs la un procedeu folosit şi cu altă ocazie, (9), cu măsurile de precauţie necesare semnalate ulterior de noi (19) (20), de legare cu nod dublu a unuia din picioarele posterioare, deasupra muşchiului gastrocnemian, în scopul de a împiedica pătrunderea fosfatului sau creatinei în piciorul legat. S-a injectat apoi în sacii dorsali limfatici, cîte 1,5 ml dintr-o soluţie de NaH_2PO_4 în doze echivalente cu 60 mg/kg corp.

După un interval de 1 oră se tăiau simultan ambele picioare, se izolau atent muşchii, se fixau în hidroxid şi se doza fosfocreatina.

Rezultatele au fost exprimate în creatinină dozată şi fosfocreatină calculată / gr muşchi umed. Menţionăm că în evaluarea rezultatelor am avut în vedere uşoara umectare a muşchilor, ca rezultat al adaosului ionului fosfat la soluţia fiziologică.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Valorile fosfocreatinei obţinute pe muşchi izolaţi, ţinuţi 1 respectiv 3 ore în soluţie suplimentară cu fosfat sau fosfat + creatină, sînt arătate

în tabela 1. După cum rezultă din tabelă, imersarea mușchiului în soluție cu fosfat conduce la o ușoară creștere a conținutului acestuia în fosfocreatină. Adaosul de creatină la soluția de fosfat nu mărește valorile fosfocreatinei.

În legătură cu efectul creatinei asupra nivelului fosfocreatinei, Hill și Stella (21) arată că aceasta are o acțiune stimulatorie cînd este adăugată la extractele musculare și că nu ar pătrunde în mușchiul intact.

Tabela I

Valorile fosfocreatinei din mușchiul gastrocnemian de broască imersat în soluție Ringer-Jendrassick cu adaos de fosfați sau fosfați + creatină.

Mușchi martor = *M*
Mușchi imersat în soluție cu fosfați = P
Mușchi imersat în soluție cu fosfați + creatină = *P + C*

	M		*P*		*P + C*		
Durata imersării (ore)	Creatinină mg/g mușchi	Fosfocreatină mg/g mușchi	Creatinină mg/g mușchi	Fosfocreatină mg/g mușchi	Creatinină mg/g mușchi	Fosfocreatină mg/g mușchi	Diferența mg/g mușchi
1	1,95	3,64	2,05	3,82			0,18
3	1,65	3,08	1,86	3,47			0,39
1	2,05	3,82	2,20	4,10			0,28
3	1,80	3,36	2,03	3,80			0,44
1	1,77	3,30	1,85	3,45			0,14
3	1,50	2,80	1,77	3,30			0,50
Media	1,78	3,33	1,96	3,66			0,32
1	1,85	3,45			1,97	3,68	0,23
3	1,52	2,83			1,85	3,45	0,62
1	1,97	3,68			2,06	3,84	0,16
3	1,71	3,19			1,90	3,54	0,35
1	1,78	3,32			1,92	3,58	0,26
3	1,62	3,02			1,83	3,42	0,40
Media	1,74	3,25			1,92	3,58	0,34

La mușchii excitați prealabil in situ, în condiții identice, cu o intensitate de curent care să nu altereze mușchii (7), se observă, după imersarea în soluția fiziologică suplimentară cu fosfat, o creștere semnificativă a conținutului în fosfocreatină (tabela 2).

Rezultatele noastre concordă cu datele din literatură (4) (2), diferă de cele publicate de Medeșan (6) și confirmă ipoteza noastră de lucru: excitarea prealabilă, în condiții brutale a unui mușchi, maschează efectul stimulator al componentelor fosfocreatinei asupra biosintezei acesteia.

După cum rezultă din tabelă, adaosul de creatină accentuează efectul stimulator al fosfaților.

Acțiunea creatinei asupra biosintezei fosfocreatinei, pusă în evidență în aceste experiențe, s-ar datora creșterii — sub influența excitației — a permeabilității membranei musculare și pătrunderii creatinei din mediul extern în mușchi.

În varianta experimentală în care s-a urmărit nivelul fosfocreatinei după administrarea componentelor ei, la mușchiul normal in situ (tabela 3), se observă o stimulare mai accentuată a biosintezei fosfocreatinei decît

Tabela II

Valorile fosfocreatinei din mușchii gastrocnemieni de broască supuși in situ, excitațiilor electrice directe, în condiții identice (2 min, 2 mA, 60 imp/min, durata unei excitații 5 m=s,) imersați în soluție Ringer-Jendrassick cu adaos de fosfați sau fosfați + creatină. Durata imersării, 1 oră.

Mușchi martor = *M*
Mușchi imersat în soluție cu fosfați = *P*
Mușchi imersat în soluție cu fosfați + creatină = *P* + *C*

	M		*P*		*P* + *C*		
	Creatinină mg/g mușchi	Fosfocreatină mg/g mușchi	Creatinină mg/g mușchi	Fosfocreatină mg/g mușchi	Creatinină mg/g mușchi	Fosfocreatină mg/g mușchi	Diferența mg/g mușchi
	1,17	2,18	1,50	2,79			0,61
	1,52	2,84	1,82	3,39			0,55
	2,62	4,89	2,96	5,52			0,63
	1,75	3,26	2,04	3,80			0,54
Media	1,77	3,29	2,08	3,87			0,58
	1,68	3,13			1,99	3,71	0,58
	1,57	2,93			2,15	3,92	0,99
	1,97	3,67			2,43	4,54	0,87
	2,04	3,80			2,60	4,85	1,05
Media	1,81	3,38			2,29	4,25	0,87

Tabela III

Valorile fosfocreatinei din mușchiul gastrocnemian de broască injectat în sacii limfatici dorsali cu soluții de fosfați + creatină. Sacrificarea s-a făcut la 1 oră de la injectare

Mușchi martor = *M*
Mușchi tratat cu fosfați + creatină = *P* + *C*

	M		*P* + *C*		
	Creatinină mg/g mușchi	Fosfocreatină mg/g mușchi	Creatinină mg/g mușchi	Fosfocreatină mg/g mușchi	Diferența mg/g mușchi
	1,97	3,67	2,65	4,94	1,27
	1,58	2,93	2,03	3,80	0,87
	1,50	2,24	1,83	3,41	1,17
	1,60	2,98	2,28	4,26	1,28
Media	1,66	2,95	2,19	4,10	1,15

în cazul mușchiului imersat în soluție suplimentată cu fosfați și creatină (tabela 1).

Menționăm că și Markiewics și Rogoskin (3) înregistrează, după administrarea de fosfat la șobolani, un surplus de fosfocreatină. Rezultatele noastre diferă însă și în acest caz de cele publicate de Medeșan(6). Diferențele ar putea să se datoreze faptului că noi am urmărit efectele componentelor fosfocreatinei pe același animal, în timp ce autorul menționat a lucrat pe loturi de broaște la care, după cum se știe, există variații individuale în conținutul mușchilor în fosfocreatină, foarte mari.

Efectul stimulator mai accentuat în condițiile organismului întreg, s-ar putea explica prin pătrunderea mai rapidă în mușchi, pe cale circulatorie, a fosfatului și creatinei.

Rezultă că administrarea la broaște și respectiv adaosul de fosfat sau fosfat + creatină la soluție fiziologică în care este imersat un mușchi normal sau excitat, mărește conținutul în fosfocreatină al mușchiului.

Rezultatele noastre arată că efectul stimulator al componentelor fosfocreatinei asupra biosintezei acesteia este mascat cînd mușchii sînt stimulați în condiții brutale (6).

CONCLUZII

1. Mușchi gastrocnemieni de broască, introduși 1 sau 3 ore în soluție fiziologică, suplimentată cu fosfat, prezintă o ușoară creștere a conținutului în fosfocreatină. Adaosul de creatină nu influențează biosinteza fosfocreatinei.

2. Imersarea, după o excitare prealabilă, în condiții blînde a unui mușchi în soluție fiziologică suplimentată cu fosfați, mărește conținutul în fosfocreatină al mușchiului.

3. Creatina pătrunde în mușchiul excitat și, în prezența fosfatului, participă la sinteza fosfocreatinei.

4. Administrarea, în sacii dorsali limfatici, a componentelor fosfocreatinei, conduc la o mai accentuată biosinteză a acesteia.

Prezentat la redacție la 14 februarie 1976

Institutul de Științe Biologice București

THE EFFECT OF PHOSPHATE ION AND CREATINE ON PHOSPHOCREATINE LEVEL FROM FROG GASTROCNEMIUS MUSCLE

SUMMARY

The administration to frogs and respectively the addition of phosphate or phosphate + creatine to the physiological saline solution in which a normal or excited muscle is immersed, increase the content of phosphocreatine in muscle.

The stimulating effect of phosphocreatine components on phosphocreatine biosynthesis is masked when the muscles are stimulated in violent conditions.

BIBLIOGRAFIE

1. P. Eggleton, G. P. Eggleton, Biochem. J. **XXI**, 190 (1927).
2. J. Nachmansohn, Biochem. Z. **208**, 237 (1929).
3. L. Markiewicz, W. A. Rogozkin, Bull. Acad. Pol. Sci., Ser. biol., **7**, 341 (1959).
4. O. Meyerhoff, D. Nachmansohn, Biochem Z. **222**, 1 (1930).
5. P. Bordi, L Ateneo Parmense ser. II, **XXVI**, 755 (1933).
6. C. Medeșan, St. Cerc. Bioch., **7**, 375 (1964).
7. E. Macovschi, T. Rădulescu, L. Scolnic, St. Cerc. Bioch., **5**, 485 (1962).

8. T. RĂDULESCU, D. COTARIU, L. SCOLNIC, St. Cerc. Bioch., **7**, 97 (1964).
9. T. RĂDULESCU, D. COTARIU, Srt. Cerc. Bioch., **7**, 243 (1964).
10. T. RĂDULESCU, L. SCOLNIC, St. Cerc. Bioch., **7**, 237 (1964).
11. H. E. MORGAN, P. J. RANDEL, D. M. REUGEN, Biochem J., **73**, 575 (1959).
12. L. PARKER, J. Biol. chem., **235**, 2477 (1960).
13. L. PARKER, J. Biol. Chem., **236**, 214 (1961).
14. J. RAAFLAUB, Helv. Physiol. et Pharmacol. Acta, **11**, 142, 157 (1953).
15. L. JENDRASSICK, I. FAISZT, Rolando Eötvös Nom. Sect. Biol., **1**, 133 (1957).
16. L. SCOLNIC, St. Cerc. Bioch., **16**, 313 (1973).
17. A. ALEXEEVA, Biochimia, **16**, 97 (1951).
18. E. MACOVSCHI, C. IORDACHE, C. DRAGOMIRESCU, St. Cerc. Bioch., **4**, 171 (1961).
19. L. SCOLNIC, St. Cerc. Bioch., **12**, 91, (1969).
20. L. SCOLNIC, St. Cerc. Bioch., **11**, 305 (1968).
21. A. V. HILL, STELLA, citat de Nachmansohn Biochem. Z., **208**, 237 (1929).

ST. CERC. BIOCHIM., 19, 2, 195—198 (1976)

COMPORTAREA UNOR COMPONENTE BIOCHIMICE DIN SERUL SANGUIN PROVENIT DE LA PORCI CU MIOPATIE EXSUDATIVĂ

M. ŞERBAN, G. DĂNICEL, ALEXANDRA LOZINSCHI, GH. CÎMPEANU

Rezumat. — În serul sanguin provenit de la porci care au prezentat miopatia exsudativă a mușchiului Longissimus dorsi, s-au pus în evidență modificări ale activității glutamat oxalacetat transaminazei și fosfatazei alcaline, precum și ale proteinemiei. Aceste modificări, corelate cu analiza și a altor componente biochimice, pot constitui indicații de orientare, privind depistarea indivizilor cu predispoziție pentru apariția miopatiei exsudative și cunoașterea cauzelor care contribuie la generarea stării PSE.

Cunoașterea ansamblului de transformări biochimice care se petrec în mușchiul de porc după sacrificare și corelarea acestor transformări cu posibilitățile de menținere a unor caracteristici optime ale cărnii, în vederea prelucrării tehnologice, constituie o importantă problemă științifică și practică. Amplitudinea proceselor biochimice ce se petrec postmortem în mușchi are un efect direct asupra calității cărnii și a produselor respective. În acest context, se încadrează și problema caracteristicilor biochimice pe care le manifestă acea stare anormală a cărnii de porc, cunoscută sub denumirea de miopatie exsudativă sau stare *PSE* (pală, moale, exsudativă).

Deși în această direcție s-au acumulat o serie de date experimentale, totuși cunoașterea efectivă a cauzelor, respectiv a factorilor și condițiilor care generează starea *PSE*, precum și a corelațiillor biochimice asociate acestor cauze nu sînt încă elucidate (1—4).

În lucrări anterioare (5—6), am evidențiat o serie de modificări pe care le prezintă diferite componente biochimice din mușchiul de porc cu miopatie exsudativă. Pornind însă de la premisa că la nivelul sîngelui s-ar putea reflecta anumite modificări precoce în procesul de apariție a stării *PSE*, ne-am propus — în această notă preliminară — să abordăm cercetarea unor componente biochimice din ser provenit de la porci ai căror mușchi au prezentat, după sacrificare, starea de miopatie exsudativă. Abordarea unor asemenea investigații la nivelul sîngelui ar putea furniza indicații utile pentru depistarea precoce a miopatiei exsudative, precum și pentru cunoașterea cauzelor care determină această stare, cu implicații nefavorabile în prelucrarea tehnologică.

Pornind de la aceste considerente, am cercetat următoarele componente din serul sanguin: proteinele, glutamat oxalacetat transaminaza (*GOT*), glutamat piruvat transaminaza (*GPT*) și fosfataza alcalină.

MATERIAL ŞI METODE

Determinările s-au efectuat pe ser sanguin: obţinut de la două loturi de porci (Marele alb-Landrace) provenite de IC-Dolj, şi anume: un lot normal şi un lot la care s-a constatat, după sacrificare, apariţia stării *PSE* (Longissimus dorsi).

Sîngele a fost recoltat fără anticoagulant; după exprimarea serului, acesta a fost separat prin centrifugare la 800 × g, timp de 15 minute. Din serul astfel, obţinut s-au efectuat următoarele determinări:

Proteinele au fost dozate spectrocolorimetric prin metoda biuretului ($\lambda = 570$ nm şi $d = 1$ cm); proteinemia a fost exprimată în g proteine la 100 ml ser (7).

Electroforeza proteinelor s-a realizat prin disc-electroforeză în gel de poliacrilamidă, utilizînd tampon Tris-glicocol de pH = 8,3; fracţiunile separate s-au evidenţiat cu Amidoblack 10 B (7).

Activitatea transaminazei GOT (EC.2.6.1.10) s-a determinat spectrocolorimetric ($\lambda = 530$ nm; d = 1 cm), pe baza reacţiei de culoare dintre acidul piruvic format şi 2,4 dinitrofenil hidrazina, utilizînd ca substrat DL alanină 200 mM şi acid α-cetoglutaric 2 mM (8—9); rezultatele s-au exprimat în UI (μ M piruvat/min/1 la 37°C).

Activitatea transaminazei GPT (EC.2.6.1.2) s-a determinat în mod similar cu transaminaza *GOT* (8—9), utilizînd însă ca substrat acid DL aspartic 200 mM şi acid α-cetoglutaric 2 mM; rezultatele au fost exprimate, de asemenea, în UI.

Activitatea fosfatazei alcaline (EC.3.1.3.1.) s-a determinat spectrocolorimetric ($\lambda = 420$ nm; $d = 1$ cm), utilizînd ca substrat *p* — nitrofenilfosfatul (7) (10); rezultatele au fost exprimate în UI(μM*p*-nitrofenol format/min/1 la 37°C).

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Dintre componentele serice investigate s-au constatat — la porcii care au prezentat miopatie exsudativă — anumite modificări la nivelul proteinelor, transaminazei *GOT* şi fosfatazei alcaline. Rezultatele obţinute sînt prezentate în tabela 1.

Tabela 1

Valorile medii ale unor componente biochimice din serul sanguin provenit de la porci normali (*N*) şi cu miopatie exsudativă (*PSE*)

	N	*PSE*	Δ%	*P*
Proteine (g% ml)	8,8±0,2	7,6±0,3	−13,8	<0,05
GOT (UI)	40,3±4,8	31,1±1,2	−22,9	0,05
GPT (UI)	45,7±5,7	47,3±3,7	+3,5	>0,05
Fosfataza alcalină (UI)	39,2±1,5	45,0±2,7	+14,8	0,05

Astfel, în comparaţie cu valoarea proteinelor din serul sanguin provenit de la indivizi normali, proteinemia la cei care au prezentat miopatie exsudativă a muşchiului Longissimus dorsi manifestă o scădere de 13,8% statistic asigurată. Această diminuare a concentraţiei proteinelor serice, corelată cu apariţia stării *PSE*, ar putea fi atribuită unui proces de exsudare a acestora sau unui deficit de sinteză asociat cu o predispoziţie pentru miopatie. De altfel, este de menţionat şi constatarea că în muşchiul miopatic se produce o diminuare a solubilităţii proteinelor sarcoplasmatice, datorită proceselor glicolitice intense însoţite de scăderea valorii pH-ului (11).

Analiza electroforetică indică la serul de porc cu miopatie exsudativă unele diferenţe în distribuţia cantitativă a tipurilor de proteine cu mobilitate intermediară (fig. 1).

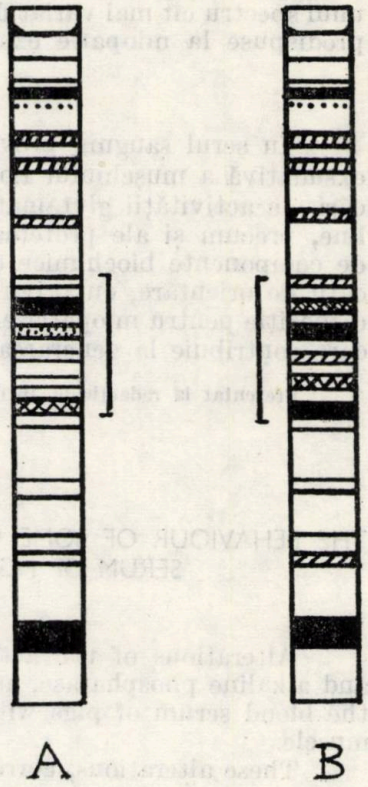


Fig. 1. — Electroforegramele proteinelor din serul de porc normal (*A*) şi cu miopatie exsudativă (*B*).

Activitatea transaminazei *GOT* din serul de porci care au prezentat, după sacrificare, miopatie exsudativă este, de asemenea, modificată în comparaţie cu lotul normal. Din tabela 1, reiese că activitatea acestei enzime este diminuată cu 22,9% fapt care se corelează cu scăderea proteinemiei. Spre deosebire însă de transaminaza *GOT*, activitatea transaminazei *GPT* nu indică modificări notabile. Diminuarea activităţii *GOT* ar putea fi atribuită unui defect de biosinteză la indivizii predispuşi pentru miopatie sau unui turnover mai mare al acestei enzime, în comparaţie cu *GPT*. Pe de altă parte, transaminaza *GOT* avînd o origine bioculară, nu este exclus ca forma citoplasmatică să fie afectată într-o mai mare măsură decît forma mitocondrială, la porci cu predispoziţie pentru miopatie exsudativă.

Activitatea fosfatazei alcaline manifestă o creştere de 14,8% în serul indivizilor la care s-a constatat apariţia stării *PSE* a muşchiului Longissimus dorsi (tabel 1). Este posibil ca această creştere să se datoreze unei solicitări mai mari a enzimei în diferite procese în care este implicată sau să fie corelată cu unele modificări la nivelul membranei celulare, în a cărei constituţie este prezentă fosfataza.

Rezultatele preliminare obţinute relevă de altfel faptul că în serul animalelor care au prezentat miopatie exsudativă, se pot depista anumite modificări în comportarea activităţii transaminazei *GOT* şi a fosfatazei alcaline, precum şi proteinemiei. Aceste modificări pot oferi indicaţii de orientare, în legătură cu predispoziţia anumitor indivizi

pentru apariţia miopatiei exsudative; totodată, prin corelarea modificărilor biochimice la nivelul serului cu cele ce se petrec post-mortem la nivelul ţesutului muscular (12), se creează posibilitatea cunoaşterii şi combaterii factorilor primari care generează starea *PSE*. În acest sens, se impune lărgirea şi aprofundarea acestor cercetări prin investigarea unui spectru cît mai variat de componente biochimice din serul animalelor predispuse la miopatie exsudativă.

CONCLUZII

În serul sanguin provenit de la porci care au prezentat miopatia exsudativă a muşchiului Longissimus dorsi, s-au pus în evidenţă modificări ale activităţii glutamat oxalacetat transaminazei şi fosfatazei alcaline, precum şi ale proteinemiei. Analiza biochimică a unui ansamblu de componente biochimice din serul sanguin de porc poate furniza indicaţii de orientare, cu privire la depistarea precoce a indivizilor cu predispoziţie pentru miopatia exsudativă, precum şi la cunoaşterea factorilor care contribuie la generarea stării anormale.

Prezentat la redacţie la 16 iunie 1976

Disciplina de biochimie
Facultatea de zootehnie
Bucureşti

THE BEHAVIOUR OF SOME BIOCHEMICAL COMPONENTS IN THE BLOOD SERUM OF PIGS WITH EXUDATIVE MIOPATHY

SUMMARY

Alterations of the activity of glutamate-oxalacetate transaminase and alkaline phosphatase, as well as of the serum proteins were found in the blood serum of pigs with exudative miopathy on Longissimus dorsi muscle.

These alterations, correlated with the analysis of other biochemical components, may represent orientative indications for the detection of individuals predisposed to exudative miopathy and for the understanding of the factors contributing to the generation of PSE state.

BIBLIOGRAFIE

1. Briskey E. J., Wismer Pedersen J., J. Food Sci., *26*, 297 (1961).
2. Sayre R. N., Briskey E. J., J. Food Sci., *28*, 292, (1963).
3. Thomas M. W., Addis P. B., Johnson H. R., Novard R. D., Judge M. D., J. Food Sci., *31*, 309 (1966).
4. Lux B., Tigali G., Riv. Zoot., *11*, 738 (1970).
5. Şerban M., Cotariu D., Iordache C., St. cerc. biochim., *2*, 219 (1972)
6. Şerban M., Cotariu D., Dănicel G., St. cerc. biochim., *4*, 429 (1973).
7. Şerban M., Lozinschi A., Cîmpeanu G., *Lucrări practice de biochimie animală*, lito 1975.
8. Reitman S., Frankel S., Amer. J. Clin. Path, *28*, 56 (1956).
9. Richterich R., *Clinical chemistry*. Ed. S. Karger, Basel, New York, 1969.
10. Richterich R., E. Gautier, Schweiz. med. Wschr., *92*, 781 (1962).
11. Mc Longhlin J. V., J. Food Sci., *33*, 383 (1968).
12. Şerban M., Cotariu D., *Biochimia contracţiei musculare*, Ed. Acad. R. S. România, 1970.

ST. CERC. BIOCHIM. 19, 2, 199–202 (1976)

MODIFICĂRI ALE CANTITĂȚII DE LIPIDE ȘI FOSFOLIPIDE LA GĂRGĂRIȚA SFECLEI (*BOTHYNODERES PUNCTIVENTRIS GERM.*) INTOXICATĂ CU HCH (HEXACLORCICLOHEXAN)

ADELA ȘTEFAN, ADRIANA VĂCARU

Rezumat. — S-a urmărit acțiunea diferitelor concentrații de γHCH (hexaclorciclohexan), asupra mortalității și conținutului în lipide și fosfolipide la gărgărița sfeclei (*Bothynoderes punctiventris Germ*).
Experiențele efectuate pe 250 de insecte adulte, au arătat că procentul de mortalitate crește cu concentrația toxicului. Rezultatele obținute au mai arătat că lipidele scad mai mult decît fosfolipidele.

Studiul acțiunii HCH-ului (Hexaclorciclohexan) asupra gărgăriței sfeclei, a constituit obiectul numeroaselor cercetări stabilindu-se care sînt concentrațiile optime ce produc intoxicația în diferite condiții de laborator și teren (5). S-a constatat însă, că după un anumit timp de la tratamentul cu acest produs, insectele devin mai puțin sensibile la concentrațiile de toxic ce au fost stabilite cu ani în urmă și ca urmare este necesar ca doza de HCH folosită în tratament să crească. Deoarece preparatul HCH ca și toate insecticidele organice clorurate este liposolubil, creșterea dozei poate avea repercusiuni negative atît asupra plantelor tratate cît și asupra organismului animalelor ce consumă aceste plante sau produsele lor. Ca urmare se impune efectuarea unor cercetări biochimice pentru a cunoaște cauza instalării rezistenței la HCH la gărgărița sfeclei. Cunoscînd acest mecanism s-ar putea interveni pentru scăderea rezistenței la insecticide și deci mărirea sensibilității ei la toxic.

Unele cercetări efectuate în special pe musca de casă (*Musca domestica* (1)), au arătat că printre alți factori ce ar avea rol important în acest proces ar fi și conținutul în lipide. Acțiunea protectoare a lipidelor s-ar explica prin proprietatea lor de a solubiliza cantități mari de insecticid, care depozitîndu-se în acest țesut nu mai poate acționa la nivelul altor țesuturi mai sensibile.

În lucrarea prezentată ne-am propus să urmărim variația cantității de lipide din gărgărița sfeclei (*Bothynoderes punctiventris*) intoxicată cu γHCH (hexaclorciclohexan). Totodată am urmărit și influența pe care acest tratament o are asupra conținutului în fosfolipide, lipide complexe cu rol metabolic activ în sistemul nervos și citoplasma celulară în general. S-a folosit preparatul γHCH fabricat la noi în țară.

MATERIAL ȘI METODE

În cercetările noastre s-a experimentat cu adulți de gărgărița sfeclei (*Bothynoderes punctiventris Germ.*) colectați din Com. Măcești de Sus (Jud. Dolj). Insectele au fost testate primăvara la ieșirea din diapauză.

Înainte de testare au fost hrănite timp de 5 zile cu frunze de sfeclă netratate.

S-a luat apoi pentru experienţe un lot de 250 insecte care au fost împărţite în 5 grupe de cîte 50 indivizi. Primele 4 grupe de insecte au fost tratate cu HCH 98%γ în cantitate de 0,2; 0,8; 1,6 şi 3,2 μg/insectă. Un lot de 50 insecte au servit ca martor. Probele respective de insecticid au fost dizolvate în acetonă şi aplicate dorsal la articulaţia protoracelui cu mezotoracele. Insectele martor au fost tratate numai cu acetonă. Tratamentul a fost efectuat după metoda topică (6), folosindu-se microsiringa Agla. S-a lucrat la temperatura de 20—25°C şi la umiditatea relativă din laborator cuprinsă între 50—60%. Insectele s-au hrănit cu frunze de sfeclă.

Procentul de mortalitate s-a determinat după 24, 48 şi 72 ore după testarea materialului biologic.

Dozarea grăsimilor s-a efectuat pe organisme moarte folosind metoda Folch (3).

Pentru dozarea fosfolipidelor s-a luat 2 ml extract lipidic, s-a trecut într-un balon kyeldahl şi s-a adăogat 0,5 ml H_2SO_4 conc. şi 0,1 ml HNO_3 conc. S-a mineralizat pe o baie de nisip timp de 10—11 minute (pînă la complecta decolorare). Fosforul s-a dozat după metoda Fiske-Subbarow (2), folosind colorimetru tip Pulfrich.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

În urma testării insectelor s-a constatat că după 24, 48 respectiv 72 ore de la tratament, procentul de mortalitate creşte proporţional cu creşterea cantităţii de insecticid injectat (tabela 1).

Datele obţinute cu privire la variaţia cantităţii de lichide şi fosfolipide sînt redate în tabela 2.

Din analiza acestor date se constată că conţinutul lipidelor totale variază între 29,1 ± 1 şi 6,2 ± 1 mg lipide totale/1g ţesut la insectele intoxicate cu cantităţi de insecticid cuprinse între 0,2 şi 3,2 μg HCH 98% γ/insectă, faţă de martor cu un conţinut de 34±1,2 mg lipide totale/1 g ţesut.

Această scădere a cantităţii de lipide se poate explica prin aceea că, în procesul de intoxicaţie al insectei creşte intens procesul respirator care consumă o mare parte de glucide ce sînt degradate prin ciclul Krebs.

Tabela 1

Variaţia procesului de mortalitate

Timpul /h	Martor	Cantitatea de insecticid injectată μg/insectă			
		0,2	0,8	1,6	3,2
24	20	0	7,5	7,5	35
48	20	20	30	37	36
72	20	20	42	55	96

Tabela 2

Valorile cantitative ale lipidelor totale și ale fosfolipidelor din țesutul de Bothynoderes punctiventris intoxicată cu γHCH comparativ cu martorul. Valorile reprezintă media a cinci determinări

Nr. crt.	Cantitatea de HCH μg injectat insectă	Lipide totale mg/1g țesut	Fosfolipide mg./1g țesut
1	0,2	29,1±1	3,1±1,1
2	0,8	18,3±0,7	2,38±1,2
3	1,6	9,5±1,3	1,05±0,8
4	3,2	6,2±1,1	1,05±1
5	Martor	34±1,2	3,4±0,9

Acest consum intens de glucide implică intensificarea metabolismului și a celorlalte componente din organismul insectei printre care lipidele ocupă un loc important. Legătura cu metabolismul glucidic se face prin gruparea acetat. Datele din tabela 2 mai arată că componentele fosfolipidice scad în mai mică măsură comparativ cu lipidele totale. Astfel la cantitățile cuprinse între 1,6 și 3,2 μg HCH/insectă, fosfolipidele scad 1,05 ± 0,8 respectiv 1,05 ± 1 față de martor cu 3,4 ± 0,9 μg/1 g țesut.

La cantitățile de 0,2 și 0,8 μg HCH/insectă fosfolipidele nu suferă practic modificări.

Această scădere mai redusă a fosfolipidelor față de lipidele totale s-ar putea explica astfel; la insecte s-a dovedit că cel mai activ compus fosfolipidic din punct de vedere metabolic este inozitfosfatida (4). Hexaclorciclohexanul a cărui moleculă are o structură similară cu a inozitei ar putea interfera cu metabolismul inozitfosfatidei (1). Aceasta ar avea ca urmare o mărire a rezistenței și o scădere a efectelor toxice la dozele subletale de HCH. Aceasta se confirmă dealtfel și prin procesul scăzut al mortalității de numai 20 la cantitatea de 0,2 μg HCH/insectă.

CONCLUZII

1. Prin tratamentul gărgăriței sfeclei (*Bothynoderes punctiventris*) cu γHCH (hexaclorciclohexan) 98%γ se produce o creștere a mortalității proporțională cu cantitatea de toxic aplicată.

2. Lipidele totale scad în urma tratamentului de la 34,0 ±1,2 (martor) la 6,2 ± 1,1 la cantitatea de toxic de 3,2μg/insectă.

3. Fosfolipidele se reduc mai puțin de la 3,4 ± 0,9 (martor) la 1,05 ± 1 la cantitatea de 3,2 μg injectată/insectă.

Prezentat la redacție la 30 septembrie 1975

Facultatea de Biologie
Universitatea București
Laboratorul de carantină
Ministerul Agriculturii

THE MODIFICATION OF LIPID AND PHOSPHOLIPID CONTENT IN THE SUGAR BEET WEEVIL (*BOTHYNODERES PUNCTIVENTRIS GERM.*) INTOXICATED WITH HCH (HEXACHLOROCYCLOHEXANE)

SUMMARY

In this work there is studied the action of different concentrations of HCHγ (hexachlorocyclohexane) over the mortality and content of lipids and phospholipids in the sugar beet weevil (*Bothynoderes punctiventris* Germ.).

The experiments effectuated with 250 adult insects showed that the percent of mortality increases with the toxic concentration.

The results obtained showed also that the total lipids diminish more than the phospholipids.

BIBLIOGRAFIE

1. R. G. Bridges, J. T. Cox, Nature, **184**, 1740 (1959).
2. C. Fiske, C. Subbarow, J. Biol Chem., **66**, 375 (1925).
3. J. Folch, M. Sess, G. Sloane-Stanby, J. Biol Chem., **226**, 497 (1957).
4. G. Gilmour, *The metabolism of insects*. Oliver § Boyd, Edinburgh and London, 1965.
5. Fl. Manolache, A. Vacaru, Analele I.C.C.S.-Braşov, **3**, 155 (1972).
6. J. Robertson, P. Marion, G. Nancy, J. of Economic Entomology, **6**, 706 (1974).

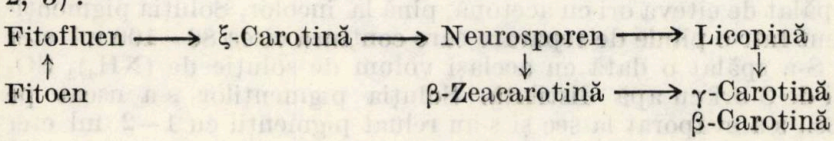
ST. CERC. BIOCHIM., 19, 2, 203–207 (1976)

EFECTUL NICOTINEI ASUPRA BIOSINTEZEI CAROTINOIDELOR ÎN *FUSARIUM AQUAEDUCTUUM**

V. TĂMAŞ, ANNEMARIE RAU-HUND şi W. RAU

Rezumat. — Nicotina inhibă carotinogeneza în general şi ciclizarea în special în culturi de *Fusarium aquaeductuum*. În experienţe cu concentraţii joase (10^{-2} M) de nicotină şi apoi îndepărtarea ei, procesul de ciclizare a carotinoidelor se reinstalează, în timp ce în experienţe cu concentraţii ridicate (3.10^{-2} şi 10^{-1} M) atît ciclizarea, cît şi carotinogeneza sînt blocate.

Biosinteza carotinoidelor cu grad înalt de nesaturare se realizează prin intermediul unei serii de transformări ce constau în reacţii de dehidrogenare şi de ciclizare, după cum rezultă din următoarea schemă (1, 2, 3):



Recent, s-a arătat că o serie de compuşi organici sînt capabili să inhibe formarea carotinoidelor ciclice. Printre aceşti compuşi se menţionează cei cu structură heterociclică cu azot (4), amide (5,6), amine (4). Experienţele au fost efectuate cu diferite culturi de microorganisme şi fungi, cum sînt *Mycobacterium marinum* (7), *Flavobacterium sp.* (8), *Phycomyces blakesleanus*, *Myxococcus fulvus* (9), *Fusarium aquaeductuum* (10) şi altele. Nicotina a fost utilizată în culturi de *Mycobacterium marinum* (7), *Flavobacterium sp.* (8) şi *Myxococcus fulvus* (9) şi s-a constatat că ea favorizează acumularea carotinoidelor ciclice şi a derivaţilor lor hidroxilici (3).

În această lucrare ne-am propus să prezentăm rezultatele privind efectul nicotinei asupra biosintezei carotinoidelor de către *Fusarium aquaeductuum*, întrucît acest fung este bine cunoscut pentru rolul său în fotoreglarea biosintezei carotinoidelor (10, 11, 12).

MATERIALE ŞI METODE

S-au efectuat mai multe experienţe cu diferite concentraţii de nicotină, în condiţii de lumină şi de întuneric, efectuînd un număr de circa 300 analize de pigmenţi.

Organisme şi condiţii de cultură. Incubarea fungilor de *F. aquaeductuum* s-a făcut pe un mediu de biomalţ, agar şi neopeptonă, la întuneric, la temperatura de [illegible]° (10). După [illegible] zile de incubare, culturile din 4 baloane au fost filtrate, spălate cu apă, apoi suspendate în apă distilată şi aduse la volumul de 900 ml. Din această suspensie s-au luat cîte 75 ml

* Lucrarea a fost executată în laboratoarele Institutului de botanică, Universitatea Ludwig-Maximilians, München, R.F. Germania.

și s-au introdus într-un vas spălător. Peste suspensie s-au adăugat 75 ml soluție nutritivă (formată din volume egale de soluție 4% glucoză și KH_2PO_4 1/30 M), cu pH = 5,6. S-a adăugat apoi soluție apoasă de nicotină de molarități diferite. S-au alcătuit cîte 3 vase cu aceeași molaritate de nicotină. Probele astfel pregătite au fost expuse la iluminare cu lumină fluorescentă (Xenon, Orsam BO, 450 W, de 95.000 Lux), o perioadă de 4 ore, timp în care s-a barbotat O_2.

După perioada de iluminare probele au fost supuse barbotării unui curent de aer timp de 22 ore. S-au filtrat, iar miceliile s-au spălat cu apă distilată. Fiecare miceliu s-a introdus într-un flacon de 100 ml, în care s-au adăugat circa 50 g perle de sticlă și 40 ml metanol.

Unele probe, după perioada de aerare, s-au spălat de 3 ori cu soluție nutritivă, s-au resuspendat în soluție nutritivă și s-au ținut la întuneric timp de 6 sau 24 ore.

Extracția pigmenților. Flacoanele cu miceliile în metanol s-au supus la agitare, la un agitator rotativ, timp de o oră, după care s-au adăugat circa 30 ml acetonă și s-a continuat agitarea încă 1/2 oră. S-a filtrat miceliul și s-a spălat de cîteva ori cu acetonă, pînă la incolor. Soluția pigmenților s-a trecut într-o pîlnie de separare care conținea circa 80—100 ml eter de petrol. S-a spălat o dată cu același volum de soluție de $(NH_4)_2\ SO_4$ 10%, apoi de 3 ori cu apă distilată. Soluția pigmenților s-a uscat pe Na_2SO_4 sicc., s-a evaporat la sec și s-au reluat pigmenții cu 1—2 ml eter de petrol.

Separarea cromatografică. Soluția de amestec de pigmenți s-a cromatografiat, în atmosferă și la presiune de azot, pe o coloană cu amestec adsorbant de Ca $(OH)_2$ și Kieselgur (Hyflo Super Cel, 5—25 μ) în raport de 5 la 1 în greutate. Developarea cromatogramelor s-a făcut cu amestec de eter de petrol și benzen, în care proporția de benzen s-a mărit pînă la 10—20%. S-au separat mecanic pigmenții și s-au eluat cu acetonă. S-a evaporat acetona, iar pigmenții s-au reluat cu un volum cunoscut de eter de petrol.

Identificarea și dozarea pigmenților. Identificarea pigmenților s-a făcut după spectrele de absorbție în ultraviolet și în vizibil (10). *cis*-Licopina a fost identificată pe mai multe căi : a) izomerizarea *trans*-licopinei în *cis*-licopină prin cataliză cu iod în eter de petrol și cocromatogramă de amestec cu cea naturală : b) izomerizarea *cis*-licopinei în *trans*-licopină ; c) *cis-peak* la 362 nm (495, 463, 440 și 362 nm, în eter de petrol). 3,4-Dehidro-licopina a fost identificată prin poziția în coloană (deasupra licopinei), culoare (violetă), maxime de absorbție (526, 493, 465 nm, în eter de petrol) și cocromatogramă de amestec cu pigment autentic natural.

Dozarea pigmenților s-a făcut spectrofotometric, cu un spectrofotometru Beckman DB, 10 Recorder. Cantitatea din fiecare pigment s-a calculat din coeficientul de extincție (10). Pentru *cis*-licopină $E^{1\%}_{1cm} = 2600$, iar pentru 3,4-dehidrolicopină $E^{1\%}_{1cm} = 3000$

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Datele selectate privind efectul nicotinei asupra biosintezei carotinoidelor de către *Fusarium aquaeductuum* sînt prezentate în tabela 1. Se observă că nicotina influențează atît formarea carotinoidelor ciclice cît

și carotinogeneza în general. O acumulare deosebită se observă la licopină, dar aceasta este în defavoarea γ-carotinei și a altor carotinoide ciclice. Acest fapt denotă că nicotina blochează ciclizarea. Faptul că conținutul în carotinoide scade de la 131,50 la 0,55 μg, denotă că nicotina are un efect de blocare a biosintezei tuturor carotinoidelor.

Tabela 1

Efectul nicotinei asupra biosintezei carotinoidelor în *Fusarium aquaeductuum*

Carotinoide (în μg/75 ml de mediu)	Miceliu cultivat la întuneric	Control (fără nicotină)	Cu nicotină			
			10^{-2}M	2.10^{-2}M	3.10^{-2}M	10^{-1}M
ξ-Carotină	0,43	5,32	6,66	6,50	0,57	urme
Neurosporen	0,10	3,00	5,60	3,90	0,03	0,01
cis-Licopină	—	urme	4,00	4,00	urme	urme
trans-Licopină	0,08	9,30	68,00	47,50	0,66	0,14
3,4-Dehidrolicopină	—	urme	urme	urme	urme	urme
γ Carotină	0,57	23,50	4,50	0,80	0,10	0,40
cis-Torulină	0,09	1,40	—	0,65	urme	urme
trans-Torulină	0,11	1,25	—	0,60	urme	—
Neurosporoxantină	0,07	87,53	8,40	1,75	urme	urme
Carotinoide aciclice	0,61	17,62	84,26	61,90	1,26	0,15
Carotinoide ciclice	0,84	113,88	12,90	2,80	0,10	0,40
Total	1,45	131,50	97,16	65,70	1,36	0,55

La îndepărtarea nicotinei din culturi, după perioada de iluminare, prin spălare cu soluție nutritivă și apoi resuspendarea culturilor în soluție nutritivă, cu ținerea la întuneric timp de 6 ore conținutul în carotinoide crește (tabela 2). Acest fapt denotă că la îndepărtarea nicotinei procesul de biosinteză este reluat. S-a remarcat o creștere deosebită în γ-carotină, ceea ce confirmă faptul că această carotinoidă se formează din licopină. Creșteri în conținutul în γ-carotină s-au remarcat în probele care au avut concentrații mai ridicate în nicotină (2.10^{-2}M), ceea ce demonstrează faptul că în prezența nicotinei ciclizarea a fost oprită, iar la îndepărtarea ei procesul a fost restabilit și raportul este în favoarea carotinoidelor ciclice. Nu același lucru s-a petrecut la probele care au avut o concentrație mai ridicată de nicotină (3.10^{-2}M), în care caz totalul în carotinoide a rămas principial același, ceea ce denotă că a fost blocat complet complexul enzimatic implicat în biosinteză, fără a mai putea fi reluat.

Prin îndepărtarea nicotinei, resuspendarea culturilor în soluție nutritivă și ținerea lor 24 de ore la întuneric, se observă o reluare a procesului de biosinteză și formarea de carotinoide ciclice, îndeosebi a γ-carotinei și a neurosporoxantinei (tabela 3).

Asupra culturilor de *Fusarium aquaeductuum* nicotina are un efect distinct în biosinteza carotinoidelor, și anume de a inhiba reversibil ciclaza. Această enzimă are ca substrat licopina, fapt ce este în concordanță cu cercetările anterioare că licopina este precursorul carotinoidelor ciclice

Tabela 2

Variația conținutului în carotinoide al micelilului de *Fusarium aquaeductuum* cultivat la lumină în prezența nicotinei, apoi spălat și resuspendat în soluție nutritivă și ținut la întuneric timp de 6 ore

Carotinoide (μg/75 ml mediu)	Control (fără nicotină)	Cu nicotină		
		10^{-2}M	2.10^{-2}M	3.10^{-2}M
ξ Carotină	6,30	9,00	5,01	urme
Neurosporen	3,01	5,03	3,20	0,25
cis-Licopină	urme	5,00	3,50	urme
trans-Licopină	13,40	69,00	58,00	urme
3,4-Dehidrolicopină	urme	urme	urme	urme
γ-Carotină	19,60	23,90	37,00	0,27
cis-Torulină	3,40	urme	1,60	urme
trans-Torulină	2,50	2,03	3,90	urme
Neurosporoxantină	73,00	13,00	20,01	urme
Carotinoide aciclice	22,71	88,03	69,71	0,25
Carotinoide ciclice	98,50	38,93	72,51	0,27
Total	121,57	127,96	132,22	0,52

Tabela 3

Variația conținutului în carotinoide al micelilului de *Fusarium aquaeductuum* cultivat la lumină în prezența nicotinei, apoi spălat și resuspendat în soluție nutritivă și ținut la întuneric timp de 24 ore

Carotinoide (μg/75 ml de mediu)	Control (fără nicotină)	Cu nicotină		
		10^{-2}M	2.10^{-2}M	3.10^{-2}M
ξ-Carotină	4,65	5,50	3,85	urme
Neurosporen	2,00	3,58	3,10	urme
cis-Licopină	1,80	4,00	5,50	urme
trans-Licopină	12,30	40,00	52,10	urme
3,4-Dehidrolicopină	urme	urme	urme	urme
γ-Carotină	16,59	15,20	26,15	0,25
cis-Torulină	0,60	urme	1,58	—
trans-Torulină	2,90	1,15	2,67	—
Neurosporoxantină	87,00	7,50	15,16	urme
Carotinoide aciclice	20,75	53,08	64,55	urme
Carotinoide ciclice	107,09	23,85	45,56	0,25
Total	127,84	76,83	110,11	0,25

(3)(7)(13)(8). Enzima devine efectivă cînd inhibitorul este înlăturat și ea utilizează carotinoida care se acumulează în concentrații mai mari, cum este licopina. În prezența unei concentrații ridicate de nicotină, ciclaza este inhibată sau dezagregată.

Formarea *cis*-licopinei și a 3,4-dehidrolicopinei, carotinoide puse în evidență pentru prima dată în *F. aquaeductuum* în această lucrare, se realizează de asemenea din *trans*-licopină. *cis*-Licopina este rezultatul acțiunii luminii asupra *trans*-licopinei, deci o fotoizomerizare. Acest fapt a fost confirmat prin expunerea *trans*-licopinei la lumină, în condițiile în care se formează în culturi. Produsul de fotoizomerizare este identic cu cel natural.

3,4-Dehidrolicopina se formează de asemenea din *trans*-licopină, ca urmare a acţiunii oxigenului, a luminii şi a pH-ului acid al mediului de cultură, foarte probabil cu formarea intermediară a unui derivat hidroxilic, care este apoi deshidratat.

În concluzie, nicotina inhibă formarea carotinoidelor ciclice şi favorizează apariţia unei concentraţii ridicate de carotinoide aciclice. Cercetările noastre viitoare vor fi axate pe dirijarea acumulărilor de carotinoide aciclice în anumite fructe şi legume.

Prezentată la redacţie
la 29.XI.1974.

Disciplina de biochimie
Institutul agronomic, Cluj-Napoca,
Botanisches Institut der Universität München

EFFECTS OF NICOTINE ON BIOSYNTHESIS OF CAROTENOIDS BY *FUSARIUM AQUAEDUCTUUM*

SUMMARY

Nicotine inhibited generally the carotenogenesis as well as cyclization, especially in *Fusarium aquaeductuum* cultures. In experiments with low levels of Nicotine (10^{-2} M) and after the nicotine was removed, the process of cyclization started all over again, while at high nicotine concentration levels ($3 \cdot 10^{-2}$ and 10^{-1} M), both cyclization and carotenogenesis were blocked up.

BIBLIOGRAFIE

1. J. W. Porter şi D. G. Anderson, *Ann. Rev. Plant. Physiol.*, **18**, 197 (1967).
2. M. D. De La Guardia, C. M. G. Aragon, F. J. Murillo, E. Cerdá-Olmedo, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., **68**, 2012 (1971).
3. H. Kleinig şi H. Reichenbach, *Biochim. Biophys. Acta*, **306**, 249 (1973).
4. M. Elahi, C. O. Chichester, K. L. Simpson, Phytochemistry, **12**, 1627 (1973).
5. M. Elahi, T. H. Lee, K. L. Simpson, C. O. Chichester, Phytochemistry, **12**, 1633 (1973).
6. L. Ninet, J. Renault, R. Tissier, Biotech. Bioeng., **11**, 1195 (1969).
7. C. D. Howes, P. P. Batra, *Biochim. Biophys. Acta*, **222**, 174 (1970).
8. T. W. Goodwin, Biochem. J., **128**, 11 (1972).
9. H. Kleinig, Arch. Microbiol., **97**, 217 (1974).
10. E. Bindl, W. Lang, W. Rau, Planta (Berlin), **94**, 156 (1970).
11. R. R. Theimer, W. Rau, Planta (Berlin), **106**, 331 (1972).
12. W. Lang, W. Rau, Planta (Berlin) **106**, 345 (1972).
13. H. M. Hill, S. K. Calderwood, L. J. Rogers, Phytochemistry, **10**, 2051 (1971).
14. T. W. Goodwin, Biochem. J., **128**, 11 (1972).

ST. CERC. BIOCHIM., 19, 2, 209–214 (1976)

CAROTINOIDE DIN INSECTE. II*,[1] CAROTINOIDE DIN OUĂ, LARVE, ELITRE ŞI INSECTE DE *PHYTODECTA FORNICATA* BRÜGG

V. TĂMAŞ, V. CIURDARU şi T. PERJU

Rezumat. — —Au fost cercetate carotinoidele din ouă, larve, elitre şi adulţi, de *Phytodecta fornicata Brügg.* În ouă şi în larve au fost identificate aceleaşi tipuri de carotinoide ca şi în plantele de lucernă. În elitre şi în insecte adulte, în afara acestor carotinoide, au fost identificate unele cetocarotinoide (echinenonă, 3,4-diceto-β-carotină, 3,4,4′-triceto-β-carotină, astaxantină şi astacină), a căror proporţie este de aproximativ 70 %. S-a sugerat o schemă a procesului de metabolizare a carotinoidelor în insectele adulte de *Phytodecta fornicata Brügg.*

Publicaţiile privind cercetarea carotinoidelor din regnul animal au luat o amploare deosebită în ultimii ani, atît în scopul cunoaşterii naturii şi distribuţiei lor, cît mai ales în vederea cunoaşterii rolului lor fiziologic şi biochimic. Au fost cercetate diferite animale, nevertebrate şi vertebrate, îndeosebi animale marine (2,3) şi insecte (1,4,5).

În privinţa direcţiilor de utilizare a carotinoidelor de către insecte, literatura de specialitate menţionează importanţa carotinoidelor în procesul de creştere (6), pentru apetit (7,8), în reproducţie (9), ca pigmenţi protectori de căldură şi lumină (10), ca agenţi de detoxifiere (11). Pentru toate aceste funcţii îndeplinite de carotinoide s-au adus dovezi experimentale, dar în unele cazuri datele sînt contradictorii. Cert este faptul că în procesul de metabolizare a carotinoidelor în insecte rezultă numeroşi compuşi care interacţionează şi participă la procese complexe din organism.

În cercetările noastre privind pigmenţii carotinoidici din insectele dăunătoare plantelor ne-am ocupat, în continuare, de cercetarea carotinoidelor din ouă, larve, elitre şi adulţi de *Phytodecta fornicata Brügg.* Această insectă este un dăunător al lucernei, denumit gîndacul roşu al lucernei, şi are o arie de răspîndire relativ redusă, cuprinzînd unele ţări din Europa, mai ales Ungaria, Bulgaria, Jugoslavia şi ţara noastră (12). Atît larvele cît şi adulţii rod frunzele şi lăstarii de lucernă, provocînd pagube care, chiar numai la prima recoltă pot atinge 25—30 % din producţie (13). Acest fapt implică şi mai mult necesitatea cercetării naturii carotinoidelor din *Phytodecta fornicata Brügg* şi corelaţia dintre carotinoidele din planta gazdă şi cele din insecte.

MATERIALE ŞI METODE

Adulţii şi larvele de *Phytodecta fornicata Brügg* s-au recoltat de pe plante de lucernă din lucerniere, iar ouăle de pe partea inferioară a frunzelor şi de pe lăstari.

* Lucrarea face parte din Programul comun de cercetare al Institutului agronomic, Cluj-Napoca, România şi Universităţii Rhode Island Kingston, S.U.A.

Extracţia carotinoidelor. Carotinoidele au fost extrase prin saponificare cu hidroxid de potasiu metanolic 10%, la 50°C (1,3). Soluţia alcalină a pigmenţilor s-a trecut în eter de petrol, prin spălare, în porţiuni mici, cu apă ce conţinea acid acetic şi apoi numai cu apă distilată. Extractul de carotinoide în eter de petrol s-a evaporat la sec şi s-a reluat într-un volum minim de benzen, în vederea cromatografierii.

Cromatografierea carotinoidelor. Carotinoidele din amestec au fost separate prin cromatografiere în strat subţire de silicagel G. Sistemul de developare utilizat a fost eter etilic/benzen 1 :3. Zonele de pigmenţi de pe cromatoplăci au fost extrase cu acetonă sau amestec de acetonă şi metanol. Valorile R_f ale pigmenţilor au fost comparate cu standarde autentice.

Identificarea pigmenţilor. Pigmenţii separaţi prin cromatografiere au fost identificaţi prin spectrul de absorbţie în vizibil şi infraroşu, repartiţia hipofazică între eter de petrol şi metanol 95%, reacţia cu HCl în eter etilic, R_f şi culoarea pe cromatoplacă, reducerea grupărilor cetonice la grupări hidroxilice şi compararea cu carotinoide autentice.

Determinări cantitative. Determinările cantitative s-au făcut spectrofotometric, cu un spectrofotometru VSU-1 Zeiss, în funcţie de extincţia la λ_{max}.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Natura şi cantitatea totală de carotinoide separate din ouă, larve, elitre şi adulţi de *Phytodecta fornicata Brügg*, precum şi din frunze proaspete de lucernă, sînt redate în tabela 1.

Tabela 1

Conţinutul total de carotinoide în ouă, larve, elitre, insecte adulte de *Phytodecta fornicata Brügg* şi în frunze de lucernă

Pigmenţi din	mg/g material proaspăt	$\lambda_{max.}$	Solvent	$E^{1\%}_{1cm}$
Ouă	0,23	450	eter de petrol	2 505
Larve	0,45	450	,,	2 505
Elitre	11,11	470	,,	2 000
Insecte adulte	1,22	470	,,	2 000
Frunze de lucernă	0,24	450	,,	2 505

Din datele prezentate în tabela 1 se desprinde faptul că ouăle şi larvele sînt relativ sărace în carotinoide, mai bogate fiind insectele adulte, iar la acestea se constată o acumulare intensă în elitre. Aceste fapte sînt în concordanţă cu datele din literatură, care arată că pigmenţii carotinoidici pot fi acumulaţi ca atare de către insecte sau metabolizaţi (1, 14, 15, 16, 17).

Lucerna, care constituie hrana pentru *Phytodecta fornicata*, conţine în frunze atît carotinoide cu structură β-iononică, cît şi cu structură α-iononică, după cum reiese din tabela 2.

Tabela 2

Carotinoidele din frunze de lucernă și unele caracteristici ale lor

Carotinoidă	Culoarea zonei pe cromatoplacă	R_f	$\lambda_{max.}$ (în eter de petrol)	Proporția (în %)	Reacția cu HCl în eter etilic	Repartiția hipofazică între eter de petrol și CH_3OH 95% (în %)
α-Carotină	galben	0,99	418, 442, 472	1	—	—
β-Carotină	portocaliu	0,96	(423), 448, 475	35	—	—
Criptoxantină	portocaliu	0,56	(423), 448, 475	0,5	—	45
Luteină	galben	0,44	419, 443, 472	43,5	—	90—95
5,6-Epoxiluteină	galben	0,36	422, 446, 470	2	albastru	90—95
Violaxantină	galben	0,25	420, 442, 471	8	albastru	90—95
Neoxantină	portocaliu	0,07	412, 434, 464	10	albastru	90—95

Tipurile de carotinoide găsite în frunzele de lucernă se regăsesc în ouă și în larve, ceea ce confirmă faptul că în aceste stadii de metamorfoză ale insectei are loc numai o acumulare a carotinoidelor din plantă, fără metabolizarea lor, după cum reiese din datele prezentate în tabelele 3 și 4.

Tabela 3

Carotinoidele din ouă de Phytodecta fornicata și unele din caracteristicile lor

Carotinoidă	Culoarea zonei pe cromatoplacă	R_f	$\lambda_{max.}$ (în eter de petrol)	Proporția (în %)	Reacția cu HCl în eter etilic	Repartiția hipofazică între eter de petrol și CH_3OH 95% (în %)
β-Carotină (cis-trans)	portocaliu	0,97	425, 446, 476	3	—	—
β-Carotină (trans-total)	portocaliu	0,75	428, 448, 478	55	—	—
Luteină	galben	0,1	419, 444, 472	40	—	90—95
5,6-Epoxiluteină	galben	0,05	418, 441, 467	urme	albastru	90—95

Tabela 4

Carotinoide din larve de Phytodecta fornicata și unele din caracteristicile lor

Carotinoidă	Culoarea zonei pe cromatoplacă	R_f	$\lambda_{max.}$ (în eter de petrol)	Proporția (în %)	Reacția cu HCl în eter etilic	Repartiția hipofazică între eter de petrol și CH_3OH 95% (în %)
β-Carotină (cis-trans)	portocaliu	0,94	425, 446, 476	6	—	—
β-Carotină (trans-total)	portocaliu	0,84	428, 448, 478	39	—	—
Luteină	galben	0,30	419, 444, 472	52	—	90—95
5,6-Epoxiluteină	galben	0,15	418, 441, 468	3	albastru	90—95
Violaxantină	galben	0,10	417, 440, 467	urme	albastru	90—95

Spre deosebire de ouă și larve, în insectele adulte (tabelele 5 și 6) se află multe ceto-carotinoide, fapt ce denotă că în organismul lor are loc metabolizarea carotinoidelor luate din plantă. Mai bogate în ceto-carotinoide sînt elitrele, în care acești pigmenți reprezintă aproximativ 70% din totalul carotinoidelor. Prezența carotinoidelor cu mai multe grupări cetonice, cum sînt 3,4-diceto-β-carotina, 3,4,4′-triceto-β-carotina și astacina, denotă că în *Phytodecta fornicata* are loc un proces intens de oxidare, care decurge în mai multe etape, implicînd hidroxi-carotinoide. Precursorul acestor transformări îl constituie β-carotina, care este principala carotinoidă din plantă (18). Este foarte probabil că unele ceto-carotinoide cu mai multe grupări cetonice, cum sînt 3,4-diceto-β-carotina 3,4,4′-triceto-β-carotina și astacina, să se formeze, ca urmare a unei reacții de oxidare catalizate de mediul bazic realizat la saponificare, din hidroxi-carotinoide, și anume : 3,4-diceto-β-carotina din 3-hidroxi-echinenonă, 3,4,4′-triceto-β-carotina din 3-hidroxi-4,4′-diceto-β-carotina, iar astacina din astaxantină. De asemenea, pentru formarea ceto-carotinoidelor ar putea exista și o altă cale, în care precursorul să fie luteina, prin analogie cu biosinteza acestor pigmenți în unele animale marine (19, 20, 21). Calea biogenetică probabilă a carotinoidelor în *Phytodecta fornicata* ar decurge prin intermediarii redați în schema 1.

Proporția relativ mare în astaxantină, care se află sub formă de ester și legată de proteine sub formă de carotinoidoproteină (3), contribuie la intensificarea culorii roșii a elitrelor insectelor adulte de *Phytodecta fornicata* Brügg. Proporția relativ mică în adulți a β-carotinei și luteinei sugerează că aceste carotinoide sînt metabolizate și, deci, sînt în concordanță cu cele arătate în schema 1.

Tabela 5

Carotinoidele din elitrele insectelor adulte de Phytodecta fornicata și unele din caracteristicile lor

Carotinoidă	Culoarea zonei	R_f	$\lambda_{max.}$ (în eter de petrol)	Proporția (în %)	Reacția cu HCl în eter etilic	Repartiția hipofazică între eter de petrol și CH_3OH 95% (în %)
β-Carotină	portocaliu	0,99	428, 448, 478	8	—	—
Echinenonă	roșu-portocaliu	0,90	451	urme	—	5
3,4-Diceto-β-carotină	roșu	0,80	463	4	—	20
3,4,4′-Triceto-β-carotină	roșu-violet	0,72	467	18	—	75
Astaxantină	roșu-violet	0,56	469	25	—	50
Astacină (forma cetonică)	roșu-violet	0,50	470	20	—	60
Neidentificat	portocaliu	0,46	448	1	—	90—95
Luteină	galben	0,44	419,444,472	10	—	90—95
5,6-Expoxiluteină	galben	0,32	418, 441, 468	1	albastru	90—95
Violaxantină	galben	0,30	418, 440, 467	1	albastru	90—95
Neoxantină	galben	0,20	412, 434, 464	1	albastru	90—95

Tabela 6

Carotinoidele din insecte adulte de Phytodecta fornicata şi unele din caracteristicile lor

Carotinoidă	Culoarea zonei	R_f	$\lambda_{max.}$ (în eter de petrol)	Cantitatea (în %)	Reacţia cu HCl în eter etilic	Repartiţia hipofazică între eter de petrol şi CH_3OH 95 % (în %)
β-Carotină	portocaliu	0,98	428, 448, 478	15	—	—
Echinenonă	roşu-portocaliu	0,94	450	1	—	5
3,4-Diceto-β-carotină	roşu	0,77	462	10	—	20
3,4,4′-Triceto-β-carotină	roşu-violet	0,54	467	8	—	75
Astaxantină	roşu-violet	0,36	469	15	—	50
Astacină (forma cetonică)	roşu-violet	0,30	470	15	—	60
Neidentificat	portocaliu	0,28	446	3	—	90—95
Luteină	galben	0,26	419, 444, 472	15	—	90—95
5,6-Epoxiluteină	galben	0,20	418,441, 468	1	albastru	90—95
Violaxantină	galben	0,17	418, 440, 467	3	albastru	90—95
Neoxantină	portocaliu-galben	0,05	412, 434, 464	4	albastru	90—95
Astacină (forma enolică)	violet	0,01	470	10	—	90—95

Schema 1

Calea probabilă de metabolizare a carotinoidelor în insectele Phytodecta fornicata Brügg
[ ] = neidentificat

β-Carotină
↓
[Izocriptoxantină]
↓
Echinenonă
↓
[3-Hidroxi-echinenonă] ⟶ [3,4′-Dihidroxi-echinenonă]
↓ ↓
3,4-Diceto-β-carotină [3-Hidroxi-4,4′-diceto-β-carotină]
↓ ↓
[4′-Hidroxi-3,4-diceto-β-carotină] [3,3′-Dihidroxi-4,4′-diceto-β-carotină]
↓
Astaxantină→Astacină
↑
↓ [β-Doradexantină]
3,4,4′-Triceto-β-carotină ↑
[α-Doradexantină]
↑
Luteină

CONCLUZII

Ouăle şi larvele de *Phytodecta fornicata* Brügg conţin aceleaşi tipuri de carotinoide ca şi planta cu care se alimentează insecta, în timp ce insectele adulte metabolizează carotinoidele plantei gazdă la ceto-carotinoide.

Prezentat la redacţie la 2 decembrie 1975

Catedra de biochimie din
Institutul agronomic „Dr. Petru Groza"
Cluj-Napoca

INSECT CAROTENOIDS. II
CAROTENOIDS FROM EGGS, LARVAE, ELITRA AND BEETLES OF *PHYTODECTA FORNICATA* BRÜGG

SUMMARY

The carotenoids from eggs, larvae, elitra and beetles of *Phytodecta fornicata* Brügg were investigated. In the eggs and larvae the same types of carotenoids with those in plants of *Medicago sativa* have been identified. Besides these carotenoids in the elitra and beetles several keto-carotenoids (echinenone, 3,4-diketo-β-carotene, 3,4,4′-triceto-β-carotene, astaxanthin and astacene) were found. The ratio of keto-carotenoids was about 70%. A possible pathway leading to the formation of keto-carotenoids in the *Phytodecta fornicata* Brügg beetle was proposed.

BIBLIOGRAFIE

1. V. TĂMAŞ, T. PERJU, St. cerc. biochim., **19**, 121 (1976).
2. W. L. LEE, Comp. Biochem. Physiol., *18*, 17 (1966).
3. H. NAKAYAMA, M. KAYAMA, H. YAMADA, S. ASAKAWA, J. Fac. Fish. Anim. Husb. Hiroshima Univ., *13*, 1 (1974).
4. J. FELTWELL, M. ROTHSCHILD, J. Zool., Lond., *174*, 1 (1974).
5. A. VEERMAN, Comp. Biochem., Physiol., *48 B*, 321 (1974).
6. R. H. DADD, A. Rev. Ent., *18*, 381 (1973).
7. J. T. DINGLE, J. A. LUCY, Biol. Rev., *40*, 422 (1965).
8. J. L. MORÈRE, C.r. hebd. Acad. Sci., Paris (D), *272*, 2229 (1971).
9. T. W. GOODWIN, Biol. Rev., *25*, 391 (1950).
10. B. M. GILCHRIST, W. L. LEE, Compt. Biochem. Physiol., *42 B*, 263 (1972).
11. N. MARSH, M. ROTHSCHILD, J. Zool., Lond., *174*, 89 (1974).
12. Z. GRADOJEVICI, Plant Protection, Beograd, *26*, 22 (1954).
13. AL. STANKOVICI, L. URI, Zast. Bilja, *18*, 317 (1967).
14. T. W. GOODWIN, *The Comparative Biochemistry of the Carotenoids*, Academic Press, London — New York, 1952, p. 248.
15. J. FELTWELL, L. R.G. VALADON, J. Insect Physiol., *18*, 2203 (1972).
16. L. R. G. VALADON, R. S. MUMMERY, Comp. Biochem. Physiol., *46 B*, 427 (1973).
17. F. LEUEMBERGER, H. THOMMEN, J. Insect Physiol., *16*, 1855 (1970).
18. T. OHNO, T. SAWACHIKA, T. HIDAKA, Insect Biochem., *2*, 29 (1972).
19. T. KATAYAMA, K. HIRATA, H. YOKOYAMA, C. O. CHICHESTER, *Bull.* Jap. Soc. Sci. Fish., *36*, 709 (1970).
20. K. HARASHIMA, Insect Biochem., *2*, 29 (1972).
21. T. KATAYAMA, H. YOKOYAMA, C. O. CHICHESTER, Int. J. Biochem., *1*, 438 (1970).

ST. CERC. BIOCHIM. 19, 2, 215–224 (1976)

REFERAT GENERAL

FOSFATAZE. ROL METABOLIC ŞI MECANISM DE ACŢIUNE

DOINA POPOV

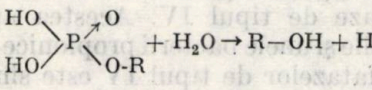
Sub denumirea de fosfataze sînt cuprinse enzime cu proprietăţi fizico-chimice şi specificităţi de substrat diverse, dar care au proprietatea comună de a cataliza hidroliza esterilor fosforici. Fosfatazele sînt deci fosfohidrolaze.

O introducere în cinetica şi mecanismul de reacţie al acestor enzime face necesară — în primul rînd — cunoaşterea principalelor tipuri de fosfataze. Avînd drept criteriu de referinţă natura legăturii chimice a substratelor scindate de aceste enzime, clasificarea enzimelor (1) cuprinde următoarele tipuri de fosfataze :

A. Fosfataze care hidrolizează legătura dintre gruparea ortofosfat şi un radical organic :

I. Fosfomonoesteraze (3.1.3 fosforic monoester hidrolaze)

Reacţia catalizată :



Fosfomonoesterazele sînt enzime mult răspîndite în regnul animal şi vegetal. Ele hidrolizează o gamă largă de monoesteri fosforici ai alcoolilor şi fenolilor (2). Biosinteza fosfomonoesterazelor este controlată de factori de mediu (la microorganisme), de factori hormonali (s-a constatat o abundenţă a fosfatazei acide din prostată, la pubertate) şi mai ales de factori genetici (deficienţa fosfatazică prezintă un caracter ereditar).

În funcţie de specificitatea lor faţă de substrate, distingem două categorii de fosfomonoesteraze : nespecifice şi specifice (2).

Fosfomonoesterazele nespecifice hidrolizează un număr mare de esteri fosforici ai mono- şi polialcoolilor, ai fenolilor, ai mono- şi dizaharidelor. Aceste enzime s-au evidenţiat la fungi, drojdii, în organele şi ţesuturile plantelor superioare (seminţe, frunze, fructe) şi în multe ţesuturi animale (prostată, rinichi, ficat, splină).

Din categoria fosfomonoesterazelor nespecifice fac parte enzime cu pH-uri optime diferite şi cu comportări caracteristice sub influenţa efectorilor adăugaţi mediului de reacţie. Pe baza acestor criterii, Folley şi Kay (după 3) grupează fosfomonoesterazele nespecifice în 5 tipuri principale :

a) Fosfomonoesteraze de tipul I (fosfataze alcaline). Aceste enzime îşi manifestă activitatea în domeniul de pH 6,5—11, cu optimul cuprins între pH 8—9. Fosfatazele alcaline sînt răspîndite cu precădere în ţesuturile şi organele animalelor. Celulele plantelor conţin puţine fosfataze alcaline (drojdii, bacterii) sau sînt complet lipsite de aceste enzime (ciuperci superioare).

Fosfatazele alcaline sînt activate de cationii bivalenţi: Mg^{2+}, Mn^{2+}, Zn^{2+}, Co^{2+}. Tot activatori, dar mai puţin eficienţi, sînt ionii de Fe^{2+}, Ni^{2+}, Ca^{2+}. Dintre inhibitorii fosfatazelor alcaline fac parte ionii de fosfat şi arsenat şi diferiţi agenţi formatori de complexe cu metalele (cianuri, compuşi sulfhidrilici, H_2S).

b) Fosfomonoesteraze de tipul II (fosfataze acide). Fosfatazele de acest tip îşi manifestă activitatea de la pH 4 la 7, pH-ul lor optim fiind 5,0—5,8. Fosfatazele de tipul II, tot atît de răspîndite la animale ca şi fosfatazele alcaline, sînt mai puţin active decît acestea. Se observă în general că ţesuturile cu activitate puternică a fosfatazelor alcaline sînt practic lipsite de fosfatază acidă. Fosfataza de tipul II este prin excelenţă fosfataza plantelor. Ea a fost decelată la bacterii, ciuperci şi plante superioare.

Ionii de Mg^{2+} şi alţi cationi bivalenţi, compuşii sulfhidrilici, aminoacizii şi cianurile nu influenţează activitatea fosfatazelor acide. Dintre inhibitori, pe lîngă ionii de fosfat şi arsenat, care sînt eficienţi asupra tuturor fosfatazelor, ionii de fluorură şi molibdat sînt inhibitori caracteristici ai fosfatazelor acide.

c) Fosfomonoesteraze de tipul III. Aceste enzime au pH-ul optim cuprins între 3,5 şi 4. Deşi fosfomonoesterazele de tipul III s-au evidenţiat în unele organe animale, sursa principală o constituie plantele. Dar, ceea ce este excepţional pentru enzimele de acest tip, este activarea lor de către cationii bivalenţi, de regulă activatori ai fosfatazelor alcaline.

d) Fosfomonoesteraze de tipul IV. Acestea au pH-ul optim 6,5. Numai eritrocitele, drojdiile şi unele bacterii propionice conţin aceste enzime. Deşi pH-ul optim al fosfatazelor de tipul IV este similar cu cel al fosfatazelor de tipul II, enzimele din această categorie se deosebesc de precedentele prin aceea că sînt activate puternic de ionii de Mg^{2+} şi Mn^{2+}.

e) Fosfomonoesteraze de tipul V. Aceste enzime au pH-ul optim 2,5. Ele au fost decelate de Courtois şi Manet la E. coli (după 3).

Interesant este faptul că fosfomonoesterazele nespecifice diferă de enzimele specifice — pentru un anumit substrat sau pentru un număr redus de substrate — şi în ce priveşte mecanismul lor de reacţie (4). Astfel, fosfatazele nespecifice sînt foarte sensibile la acţiunea inhibitorie a ionilor de fosfat rezultaţi în urma reacţiei hidrolitice; fosfatazele specifice nu sînt afectate de aceştia. În plus, fosfatazele nespecifice sînt foarte puţin inhibate de către propriile lor substrate, şi aceasta numai cînd substratele sînt în concentraţii mari; fosfatazele specifice sînt sensibile la inhibarea de către substrate.

Principalele fosfomonoesteraze specifice, grupate în funcţie de pH-ul lor optim, sînt:

1⁰) Fosfomonoesteraze specifice cu pH optim în domeniul acid:

— glucozo-1-fosfataza (3.1.3.10 D-glucozo-1-fosfat fosfohidrolază) (5);

— glucozo-6-fosfataza (3.1.3.9. D-glucozo-6-fosfat fosfohidrolază) (6)—(8);

— fitaza (3.1.3.8 myo-inozitol-hexafosfat fosfohidrolază) (9)—(11);

— fosfatidat fosfataza (3.1.3.4 L-α-fosfatidat fosfohidrolază) (12);

— fosfoprotein fosfataza (3.1.3.16 fosfoprotein fosfohidrolaza) (13);

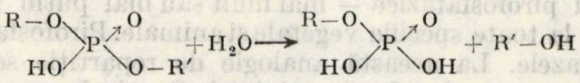
— fosforilaz fosfataza (3.1.3.17 fosforilaz fosfohidrolaza) (14)—(16).

2⁰) Fosfomonoesteraze specifice cu pH optim apropiat de 7 sau în domeniu alcalin :

— fosfoserin fosfataza (3.1.3.3 fosfoserin fosfohidrolaza) (17);
— 5′-nucleotidaza (3.1.3.5 5′-ribonucleotid fosfohidrolaza) (18);
— 3′-nucleotidaza (3.1.3.6 3′-ribonucleotid fosfohidrolaza) (19);
— hexozodifosfataza (3.1.3.11 D-fructozo-1,6-difosfat fosfohidrolaza) (20)—(24);
— trehalozo fosfataza (3.1.3.12 trehalozo-6-fosfat fosfohidrolaza) (25);
— histidinol fosfataza (3.1.3.15 L-histidinol fosfat fosfohidrolaza);
— fosfoglicolat fosfataza (3.1.3.18 fosfoglicolat fosfohidrolaza) (26) (27).

II. Fosfodiesteraze (3.1.4 fosforic diester hidrolaze)

Reacţia catalizată :



O clasificare a acestor enzime foloseşte drept criteriu natura substratelor hidrolizate :

a) Nucleofosfodiesteraze, care — pe lîngă alte substrate — hidrolizează ARN-ul, şi

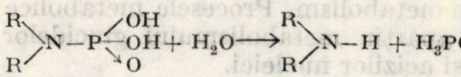
b) Lipofosfodiesteraze, care hidrolizează fosfolipidele şi derivaţii lor. Ele erau cunoscute mai demult sub denumirea de fosfolipaze sau lecitinaze C şi D.

— fosfolipaza C (3.1.4.3. fosfatidilcolin colin fosfohidrolaza) (28);
— fosfolipaza D (3.1.4.4 fosfatidilcolin fosfatidohidrolază) (29).

S-a constatat că difenilfosfatul este un substrat hidrolizat specific de fosfodiesteraze ; acest substrat este rezistent la acţiunea fosfomonoesterazelor. În ultimul timp, bis-(p-nitrofenil)fosfatul a devenit reactivul de grup ce distinge fosfomonoesterazele de fosfodiesteraze. Acest substrat are avantajul unor măsurători colorimetrice directe, însă prezintă şi dezavantaje. El este atacat destul de slab de fosfodiesteraza din veninul de şarpe ; în plus, majoritatea nucleazelor — care sînt fosfodiesteraze — nu acţionează asupra acestui substrat. Un alt dezavantaj îl constituie descoperirea unor polifosfataze care şi ele atacă acest substrat.

III. Fosfoamidaze (3.9.1.1 fosfoamidhidrolaze)

Reacţia catalizată :



Aceste enzime acţionează asupra legăturii amidice care uneşte restul ortofosforil cu o grupare aminică primară de tipul celei din fosfocreatină şi fosfoarginină. S-au caracterizat două fosfoamidaze : una cu pH optim 9 (rinichi, venin de şarpe) şi alta cu pH optim 5,2 (tărîţe de orez) (30).

IV. *Acilfosfataze (3.6.1.7 acilfosfat fosfohidrolaze)*
Reacţia catalizată :

$$\text{Acilfosfat} + H_2O \rightarrow \text{acid} + H_3PO_4$$

Ţesuturile animale (muşchi şi ficat) conţin o enzimă care hidrolizează acetilfosfatul şi homologii lui superiori (propionil-, butiril-, şi succinilfosfatul). Ea s-a denumit acilfosfatază. Enzima este distrusă de tripsină dar prezintă o rezistenţă excepţională faţă de alţi agenţi denaturanţi (30)(31).

B. Fosfataze care scindează legătura dintre doi radicali fosforici.

1. Pirofosfataza anorganică (3.6.1.1 pirofosfat fosfohidrolază) (32)(33).
Reacţia catalizată :

$$\text{Pirofosfat} + H_2O \rightarrow 2\ H_3PO_4$$

Activităţi pirofosfatazice — mai mult sau mai puţin intense — s-au decelat practic la toate speciile vegetale şi animale. Pirofosfatazele însoţesc fosfomonoesterazele. La această analogie de repartiţie se adaugă dificultatea de separare a celor două activităţi. O cale de separare a pirofosfatazelor de fosfomonoesteraze o constituie inactivarea selectivă a acestora din urmă.

2. ATP-aza (3.6.1.3 ATP-fosfohidrolaza) (34) (35).
Reacţia catalizată :

$$ATP + H_2O \rightarrow ADP + H_3PO_4$$

Multe proprietăţi ale ATP-azelor sînt similare celor ale fosfatazelor nespecifice. Acestea sînt : pH-ul optim acid, coincidenţa ambelor activităţi de gel-filtrarea pe Sephadex G—200 şi la electroforeză în gel de amidon, inhibarea lor sub acţiunea colorantului anionic Trypan-Blue (36).

3. Apiraza (3.6.1.5 ATP-difosfohidrolaza) (37) (38)
Reacţia catalizată :

$$\text{Nucleoziddifosfat} + H_2O \rightarrow \text{nucleotid} + H_3PO_4.$$

4. Nucleotid pirofosfataza (3.6.1.9 dinucleotid nucleotido hidrolaza) (39) (40).
Reacţia catalizată :

$$\text{dinucleotid} + H_2O \rightarrow 2\ \text{mononucleotide}$$

Diversitatea tipurilor de fosfataze atestă o diversitate de intervenţii ale acestor enzime în metabolism. Procesele metabolice principale la care participă fosfatazele aparţin metabolismului glucidelor, lipidelor, amino acizilor, proteinelor şi acizilor nucleici.

În metabolismul glucidelor, fosfatazele intervin în următoarele tipuri de reacţii :

A. Reacţii aparţinînd unor căi metabolice opuse, care prezintă intermediari comuni ;

B. În procesele de reglare, prin mecanisme de fosforilare-defosforilare a activităţii unor enzime şi

C. În metabolismul acizilor fosfoglicerici.

În căile metabolice care folosesc aceiași metaboliți intermediari pentru efectuarea de reacții de biosinteză, cît și de degradare (cum ar fi, de exemplu, gluconeogeneza, efectuată pe cale inversă glicolizei), există situații în care o enzimă dintr-o cale metabolică catalizează conversia unui substrat la un produs care poate fi transformat în substratul inițial, printr-o enzimă din secvența metabolică opusă. O astfel de cuplare între enzime din glicoliză și gluconeogeneză se realizează la nivelul a două cupluri în care intervin fosfataze : fosfofructokinază (PFK)-fructozo-1,6-difosfatază (FDP-ază) și glicogen-fosforilază-glicogen sintetază.

Intervenția fosfatazelor în primul din aceste cupluri a fost discutată recent de Mansour și Seltow (41) și de Clark și col. (42). În glicoliză, PFK catalizează în prezența Mg^{2+} și ATP-ului fosforilarea fructozo-6-fosfatului, cu formare de fructozo-1,6-difosfat. Hidroliza acestui compus, cu refacerea fructozo-6-fosfatului, este realizată de FDP-ază, enzimă gluconeogenetică. Cuplarea acțiunii PFK și FDP-azei este realizată prin acțiunile contrarii exercitate de diferiți efectori asupra uneia sau celeilalte din enzime. Reactivii sulfhidrilici activează FDP-aza și inhibă PFK, fapt ce sugerează controlul activității acestor două enzime de către nivelul compușilor sulfhidrilici celulari. AMP și FDP activează PFK și inhibă FDP-aza. Final, aceasta se traduce prin stimularea glicolizei, inhibînd glucogeneza. ATP-ul are o acțiune inversă : inhibă PFK și activează FDP-aza, ducînd la stimularea gluconeogenezei și întîrzierea glicolizei.

Alte două reacții metabolice opuse în care intervin fosfatazele sînt cele din cuplul glicogen fosforilază-glicogen sintetază (43) (44) (45). Ambele enzime există sub forme fosforilate și defosforilate. Fosforilaz-kinaza catalizează în prezența ATP-ului conversia fosforilazei *b* în fosforilază *a*. În acest proces de fosforilare, asociată activării, gruparea fosfat terminală a ATP-ului se fixează la un rest de serină al moleculei enzimei. Întrucît fosforilaza *b* este un dimer, fosforilarea este însoțită și de o dimerizare a produsului format, fosforilaza *a* fiind un tetramer. Fosforilaza *b* este refăcută sub acțiunea fosforilaz-fosfatazei, care eliberează hidrolitic fosfatul legat de fosforilaza *a*.

Ca și fosforilaza, fosforilaz-kinaza poate exista într-o formă fosforilată și una defosforilată. În prezența ATP-ului și Mg^{2+} fosforilaz-kinaza se activează, proces însoțit de fosforilarea proteinei. Defosforilarea, catalizată de o fosforilaz-kinaz fosfatază, realizează inactivarea acesteia.

Spre deosebire de glicogen fosforilază, la care forma fosforilată este cea enzimatic activă, în cazul glicogen sintetazei forma fosforilată este cea inactivă (glicogen sintetaza D). Reactivarea enzimei este realizată de o sintetaz-fosfatază, care transformă glicogen sintetaza în forma I (activă). Există dovezi că și glicogen-sintetaz-fosfataza poate exista în formă fosforilată, activă, și în formă defosforilată, inactivă, la defosforilare participînd o fosfatază specifică.

Kato și col. (46) au presupus că în mușchiul scheletic de iepure ar exista o singură fosfoprotein-fosfatază cu activitate fosforilaz-fosfatazică, fosfohiston—fosfatazică și glicogen-sintetaz D fosfatazică. Comportarea acestor fosfataze în prezența ionilor metalelor bivalente atestă însă participarea unor enzime diferite în defosforilarea fosforilazei *a*, a histonelor fosforilate și a glicogen sintetazei D.

Killilea și col. (47), sintetizînd unele cercetări recente, admit că o singură proteină fosfatazică prezintă activitate triplă: fosforilaz-fosfatazică, fosforilaz-kinaz-fosfatazică și glicogen sintetaz-fosfatazică. Se postulează, că această fosfatază cu specificitate multiplă ar exista în celule sub forma unui complex inactiv, enzimă-inhibitor. Complexul este activat sub acțiunea unor metaboliți intermediari sau produși ai influenței unor hormoni, eliberînd subunitatea catalitică și formînd un complex metabolit-inhibitor. Deși incomplet stabilit, mecanismul descris pare a răspunde unor observații experimentale: glicogen sintetaz-fosfataza hepatică și protein fosfataza țesutului adipos sînt enzime a căror activitate este crescută în prezență de insulină.

Un al doilea proces în care intervin fosfatazele este cel de reglare, prin mecanisme de fosforilare-defosforilare, a activității unor enzime din metabolismul glucidelor. Aceste modificări reglatoare s-au demonstrat pentru următoarele enzime:

Enzime defosforilate	*Enzime fosforilate*
fosforilaza b(inactivă)	fosforilaza a (activă)
glicogen sintetaza I (activă)	glicogen sintetaza D (inactivă)
PFK (inactivă)	PFK (activă)
FDP-aza (activă)	FDP-aza (inactivă)
piruvat dehidrogenaza(PDH) (activă)	PDH(inactivă)

FDP-aza suferă o interconversie reversibilă, de la o formă defosforilată (enzimatic activă — FDP-aza *a*) la o formă fosforilată (enzimatic inactivă — FDP-aza *b*). Viteza fosforilării este reglată de concentrațiile intracelulare de AMP, ADP și ATP, ca și de acizii grași, acizii tricarboxilici și de alte substrate oxidabile. Reactivarea enzimei este catalizată de o fosfatază specifică (45).

Walajtys și col. (48) au demonstrat implicarea mecanismelor reglatorii de fosforilare-defosforilare în activitatea complexului piruvat dehidrogenazic. Piruvat dehidrogenaz-kinaza — puternic legată de transacetilază, subunitatea catalitică a complexului — fosforilează în prezență de Mg^{2+} și ATP un rest de serină, inactivînd PDH. Piruvat dehidrogenaz-fosfataza îndepărtează fosfatul legat covalent de enzimă și o reactivează.

Reglarea prin fosforilare-defosforilare a activității complexului PDH este realizată sub influența ionilor de Mg^{2+} și Ca^{2+} și de variațiile raportului ATP/ADP. Se admite, în general, că fosforilarea ar favoriza activarea reacțiilor catabolice și inactivarea celor anabolice (47), contribuind la reglarea și controlul proceselor intracelulare.

Mecanismele de fosforilare-defosforilare reglează și activitatea unor proteine cromozomiale. S-a descris, astfel, o fosfatază care hidrolizează specific histonele și protaminele fosforilate (49).

Un alt proces în care intervin fosfatazele este legat de metabolismul acizilor 1,3-difosfogliceric (PGA) și 2,3—PGA (50). În eritrocite, pe lîngă calea catalizată de fosfoglicerat kinază pentru eliberarea energiei macroergice conținute în molecula 1,3-PGA, există și o altă cale, de defosforilare a 1,3-PGA sub acțiunea unei fosfataze. Existența acestei căi este legată de capacitățile reduse ale eritrocitelor de a produce și cheltui energie. În cazul unui flux glicolitic crescut, crește concentrația 2,3-PGA și este inhibată acțiunea enzimei opuse, 2,3-difosfoglicerat fosfataza, care catalizează refacerea

3-PGA. Se pare însă că și difosfoglicerat mutaza este o enzimă interconvertibilă, ce alternează între forme fosforilate și defosforilate.

Dintre fosfomonoesterazele specifice, în metabolismul lipidic intervin fosfatidat hidrolaza și fosfoserin fosfataza, iar dintre fosfodiesteraze, fosfolipazele C și D. Unele fosfataze microzomale (din țesut tumoral de șoarece) sînt implicate în reglarea biosintezei și degradării lipidelor ce conțin legături eterice. Chae și col. (51) au arătat că alkil-dihidroxiaceton fosfatul poate suferi o reducere (în prezență de NADPH sau NADH), ducînd astfel la fosfolipide complexe, sau poate suferi o defosforilare, cu formare de alkil dihidroxiacetonă. Reacțiile catalizate de fosfataze sînt realizate în sens invers de kinaze ATP și Mg^{2+} dependente.

În sfîrșit, cercetările noastre au relevat intervenția, în procesul de germinare a seminţelor de porumb, a unor scindări de complexe lipoproteice, cu activitate fosfatazică acidă (52).

Complexul sintazei acizilor grași din ficatul de porumbel (53) a fost izolat în formă fosforilată (inactivă) și defosforilată (activă), forme interconvertibile „in vitro". O enzimă limitantă de viteză în calea de sinteză a acizilor grași, acetil-CoA-carboxilaza este de asemenea fosforilată „in vitro" (54).

În metabolismul aminoacizilor fosfatazele intervin în biosinteza serinei și histidinei (55), iar la nivelul metabolismului proteic, în defosforilarea histonelor. Grisolia și Hood (49) au descris existența unei acil fosfataze care împiedică acumularea unor nivele mult prea mari de carbamilfosfat în celule, reglînd astfel ciclul ureogenetic. Carbamilfosfatul pare a fi un substrat preferențial pentru activitatea fosfatazei K^+-dependente din creierul de cobai (56).

În metabolismul acizilor nucleici iau parte 3′-nucleotidaza, dintre fosfomonoesterazele specifice, ribonucleaza dintre fosfodiesteraze și nucleotid pirofosfataza, dintre fosfatazele care scindează legătura dintre doi radicali fosforici. Bernovsky și Utter (57) au arătat că în mitocondriile de drojdie intervine o fosfatază care transformă NADP în NAD.

Acțiunea hidrolazică constituie tipul principal de reacții catalizate de fosfomonoesteraze. Reacțiile care au loc sînt reacții ordonate de tip Uni-Bi (58). Enzima se unește cu substratul, se disociază primul produs de reacție — inhibitor necompetitiv — se formează un complex covalent enzimă-substrat, acesta se izomerizează într-un complex ionic, iar final se eliberează ultimul produs de reacție, inhibitor competitiv al acesteia.

Tomaszewski și Buchowicz (59) au arătat că preparatele de fosfatază acidă vegetală catalizează în prezență de alcool metilic sau etilic, în concentrație de peste 20%, o alcooliză a UMP, GMP, CMP și AMP. Sub aceste valori de concentrație a alcoolilor, fosfatazele catalizează exclusiv hidroliza nucleotidelor.

Un alt tip de reacții catalizate de fosfataze sînt cele de transfer al radicalilor ortofosforil de la substrate donoare, la acceptori posedînd funcția de alcool primar (metanol, n-propanol).

Fosfatazele prezintă o cinetică de reacție de tip Michaelis-Menten. S-a pus problema de a cunoaște care grupări ale moleculei enzimei intervin în formarea complexului enzimă-substrat. Pe baza alurei curbelor de variație pK/pH și logV/pH, s-a stabilit în cazul fosfatazei acide (60) intervenția a trei grupări a căror stare de ionizare afectează

activitatea enzimei: pK 4,6—4,8 (o grupare carboxil), pK 4,9—5,3 (o grupare imidazolică a histidinei) şi pK 6,8 (o grupare fosforică monoionizată). Pe baza considerentelor de mai sus, Alvarez (61) figurează astfel mecanismul reacţiei de hidroliză catalizată de fosfataza acidă (fig. 1):

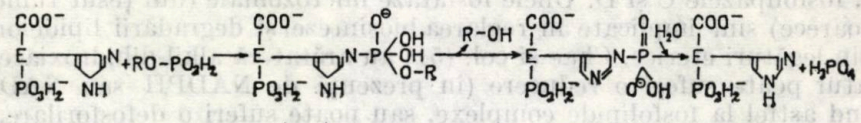


Fig. 1

Enzima, prin azotul terţiar al inelului imidazolic, se fixează nucleofilic la atomul de fosfor al substratului. Se formează astfel o fosforil-enzimă (complexul I). Acesta elimină R—OH şi trece în complexul II. În fine, acest complex transferă gruparea sa fosforil unei molecule de apă, formînd H_3PO_4 şi refăcînd enzima intrată în reacţie. Cercetările efectuate au atestat natura complexelor I şi II: primul este un complex covalent, iar al doilea ionic.

Investigarea mecanismului de reacţie al fosfatazei alcaline din E. coli (62) a arătat intervenţia în reacţia catalitică a unei grupări cu pK 7,4. În formarea complexului enzimă-substrat pare a fi implicată o grupare a enzimei cu pK 9,2 şi o moleculă de apă coordinată la atomul de Zn^{2+} din centrul activ. Date recente (63) pledează însă pentru un mecanism de tip Flip-flop al enzimei. Un mecanism similar a fost evidenţiat şi în cazul fosfatazei alcaline din intestinul de viţel (64). Enzima este alcătuită din două subunităţi identice, dar neechivalente în ce priveşte capacitatea de interacţie cu substratele, cu analogii acestora ca şi cu fosfatul anorganic, produs al hidrolizei. Unirea enzimei cu substratul are loc numai la nivelul uneia din subunităţile enzimei. Într-o a doua etapă se fosforilează un rest de serină de la centrul activ al enzimei, desprinzîndu-se simultan forma alcoolică a substratului. Enzima fosforilată leagă apoi o a doua moleculă de substrat, formînd o structură hibridă ce conţine complexul Michaelis la nivelul uneia din subunităţi şi a doua subunitate fosforilată. Această formă poate fie să elibereze fosfat anorganic, fie să formeze produsul alcoolic şi un intermediar difosforilat al enzimei.

Acelaşi tip de mecanism de reacţie pare a interveni şi în acţiunea nucleoziddifosfatazei (65).

Prezentat la redacţie 27 mai 1976

Institutul de Ştiinţe biologice, Bucureşti

BIBLIOGRAFIE

1. * * * *Report of the Commission on Enzymes of the International Union of Biochemistry*, Pergamon Press (1961).
2. G. Schmidt, M. Laskowski, *The Enzymes* (ed. P. D. Boyer, H. Lardy, K. Myrbäck) vol. V, p. 2, Academic Press, New York (1961).
3. W. F. Bridgers, Arch. Biochem. Biophys., **133**, 201 (1969).
4. J. E. Courtois, A. Lino, Forschr. Chem. Org. Naturstoffe (ed. L. Zechmeister), **19**, 316 (1961).
5. T. C. Stadtman *The Enzymes* (ed. P. D. Boyer, H. Lardy, K. Myrbäck) vol. V, p. 59, Academic Press, New York (1961).

6. W. Colilla, R. C. Nordlie, Biochim. Biophys. Acta **309**, 328 (1973).
7. C. F. Cori, R. G. Garlaud, W. Hisa-Fek, Biochemistry **12**, 3126 (1973).
8. B. K. Wallin, W. J. Arion, J. Biol. Chem., **248**, 2380 (1973),
9. G. C. J. Irving, D. J. Cosgrove, J. Bacteriol., **112**, 434 (1972).
10. N. C. Mandal, S. Burman, B. B. Biswas, Phytochemistry **11**, 495 (1972).
11. P. E. Lim, M. E. Tate, Biochim. Biophys. Acta **302**, 316 (1973).
12. K. J. Kako, S. D. Patterson, Biochem. J. **152**, 313 (1975).
13. Chiharu Nakai, J. A. Thomas, J. Biol. Chem., **249**, 6459 (1974).
14. R. Zech, K. Zurcher, Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem., **354**, 583 (1973).
15. T. M. Martensen, J. E. Brotherton, D. J. Graves, J. Biol. Chem., **248**, 8323, 8329, 8333 (1973).
16. H. Brandt, S. D. Killilea, E. Y. C. Lee, Biochim. Biophys. Res. Commun., **61**, 548, 598 (1974).
17. F. C. Neuhaus, W. L. Byrne, J. Biol. Chem., **235**, 2019 (1960).
18. C. P. Price, P. G. Hill, H. G. Sammons, Clin. Chim. Acta **33**, 260 (1971).
19. L. Schuster, N. O. Kaplan, Meth. in Enzymol., **2**, 551 (1955).
20. C. L. Sia, S. Traniello, S. Pontremoli, B. L. Horecker, Arch. Biochem. Biophys., **132**, 325 (1969).
21. H. J. Kolb, G. M. Grodsky, Biochemistry **9**, 4900 (1970).
22. S. J. Benkovic, J. J. Kleinschuster, M. M. de Maine, I. J. Siewers, Biochemistry **10**, 4881 (1971).
23. E. Grazi, E. Magri, S. Traniello, Biochim. Biophys. Res. Commun., **54**, 1321 (1973).
24. A.G. Datta, B. Abrams, T. Sasaki, J. W.D. Van den berg, S. Pontremoli, B. L. Horecker, Arch. Biochem. Biophys., **165**, 641 (1974).
25. M. Matula, M. Mitchell, A.D. Elbein, J. Bacteriol., **107**, 217 (1971).
26. D. E. Anderson, N. E. Tolbert, Methods in Enzymol., **9**, 646 (1966).
27. G.A. Codd, M. J. Merrett, Plant. Physiol., **47**, 640 (1971).
28. S. Gatt, Y. Barenholz, Ann. Rev. Biochem., **42**, 67 (1973).
29. R. McDawson, N. Hemington, Biochem. J., **102**, 76 (1967).
30. J. Roche, *The Enzymes* (ed. J. B. Sumner, K. Myrback), vol. I, p. 474 (1950).
31. G. Ramponi, A. Guerritone, C. Treves, P. Nassi, V. Baccari, Arch. Biochem Biophys., **130**, 362 (1969).
32. A. M. El Badry, J. A. Bassham, Biochim. Biophys. Acta **197**, 308 (1970).
33. B. S. Cooperman, Ning Yu Chiu, R. H. Bruckman, G. J. Bunick, G. P. McKenna Biochemistry **12**, 1665 (1973).
34. P. J. C. Kuiper, Biochim. Biophys. Acta, **250**, 443 (1971).
35. M. G. Silvestrini, A. M. Sechi, G. Parenti-Castelli, L. Masolti, G. Lenaz Ital. J. Biochem., **21**, 256 (1973).
36. M. R. Atkinson, G. M. Polya, Austral. J. Biol. Sci., **20**, 1069 (1967).
37. Y. Montalar-Lepes, Ann. Fac. Quim. farm. Univ. Chile **20**, 87 (1968); Biol. Abstr. 51, Nr. 132742.
38. A. C. Traverso, S. Traverso, H. Reyes, Arch. Biochem. Biophys., **137**, 133 (1970).
39. R. Penniall, J. P. Holbrook, N. Mc. Davidian, W. C. Elliot, Biochim. Biophys. Acta, **157**, 258 (1968).
40. C. Nozzolillo, C. Godin, J. Exp. Bot., **22**, 262 (1971).
41. T. E. Mansour, B. Setlow, *Biochemical regulatory mechanisms in eukaryotic Cells* (ed. E. Kun, S. Grisolia), 1972, cap. 3.
42. M. G. Clark, P. D. Bloxham, P. C. Holland, H. A. Lardy, J. Biol. Chem., **249**, 279 (1974).
43. E. R. Stadtman, *The Enzymes, Structure and Control*, vol. I (Ed. P. D. Boyer), Academic Press, New York, London, 1970, p. 413.
44. R. H. Hasche, L. Heilmeyer, Jr., E. Helmreich, Metabolic Interconversion of Enzymes, 1972, p. 405.
45. H. Holzer, W. Dunze, *Biochemical regulatory mechanisms in eukaryotic cells* (Ed. E. Kun, S. Grisolia), 1972, Willey Interscience, cap. V.
46. K. Kato, M. Kobayashi, S. Sato, Biochim. Biophys. Acta, **371**, 89 (1974).
47. S. D. Killilea, H. Brandt, E. Y. C. Lee, Trends in Biochemical Sci., **1**, 30 (1976).
48. E. Walaytys, D. P. Gottesman, J. R. Williamson, J. Biol. Chem., **249**, 1857 (1974).
49. S. Grisolia, W. Hood, *Biochemical regulatory mechanisms in eukaryotic cells* (Ed. E. Kun, S. Grisolia), 1972, Willey Interscience, p. 137.
50. J. B. Alpers, *Biochemical regulatory machanisms in eukaryotic cells* (Ed. E. Kun, S. Grisolia), 1972, Willey Interscience, p. 33.

51. K. Chae, C. Piantadosi, F. Snyder, J. Biol. Chem., **248**, 6618 (1973).
52. V. Alexandrescu, D. Popov, Rev. roum. Biochim., **6**, 105 (1969).
53. A. A. Quershi, R. A. Jenik, M. Kim, F. A. Lornitzo, J. W. Porter, Biochim. Biophys. Res. Commun. **66**, 344 (1975).
54. C. A. Carlson, K. H. Kim, Arch. Biochem. Biophys., **164**, 478 (1974).
55. A. Wiater, K. Krajewska Grinkievicz, T. Klopotowski, Acta Biochim. Polon., **18**, 299 (1971).
56. H. Yoshida, F. Izumi, K. Nagai, Biochim. Biophys. Acta, **120**, 183 (1966).
57. C. Bernovski, M. F. Utter, Science, **159**, 1362 (1968).
58. W. W. Cleland *The Enzymes* (Ed. P. D. Boyer), Academic Press, New York, London, vol. II, 1970, p. 4.
59. M. Tomaszewski, J. Buchowicz, Biochem. J., **124**, 189 (1971).
60. M. Igarashi, H. Takasashi, N. Tsuiama, Biochim. Biophys. Acta, **220**, 85 (1970).
61 E. F. Alvarez, Biochim. Biophys. Acta, **59**, 663 (1962).
62. M. Krisnaswamy, U. W. Kenakare, J. Biol. Chem., **245**, 3956 (1970).
63. W. Bloch, M. J. Schlesinger, J. Biol. Chem., **249**, 1760 (1974).
64 H. J. Fromm, *Initial Rate Enzyme Kinetics*, Springer Verlag, Berlin Heidelberg, New York, 1975, p. 262.
65. V. L. Schramm, J. F. Morrison, Biochemistry, **8**, 3821 (1969).

RECENZII

Diabetes mellitus A (Oberdisse, K. ed.). în: *Handbuch der inneren Medizin*, ediția 5, vol. 7, partea 2A, 886 pagini, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1975.

Reunind o echipă valoroasă de cercetători și clinicieni, editorul K. Oberdisse a reușit să realizeze o sinteză de cea mai bună calitate a cunoștințelor actuale privind diabetul zaharat.

Tratatul debutează cu un istoric în care sînt trecute în revistă principalele rezultate morfologice, biochimice și fiziopatologice care au condus la caracterizarea complexă a acestei maladii metabolice. Capitolul următor este dedicat morfologiei normale și patologice a țesutului insular, o atenție specială fiind acordată interrelațiilor morfofuncționale dintre diferitele tipuri de elemente endocrine. În celelalte capitole ale lucrării sînt analizate în detaliu probleme deosebit de variate interesînd proprietățile fizice, chimice, imunologice și biologice ale insulinei, secreția hormonului precum și efectele sale metabolice. Alte capitole tratează despre interrelațiile pancreasului endocrin și hipofiză, corticosuprarenale și tiroidă în condițiile diabetului zaharat ca și despre efectele metabolice ale cateholaminelor. Părți speciale ale lucrării sînt consacrate diabetului experimental și spontan, etiologiei, epidemiologiei și patogenezei acestei maladii. În sfîrșit, lucrarea cuprinde numeroase informații asupra diagnosticului diverselor forme de diabet și se încheie cu un capitol amplu dedicat aspectelor medicale ale diabetului în graviditate.

Prin multiplele aspecte pe care le abordează, tratatul poate fi considerat ca una dintre cele mai reușite lucrări apărute pînă în prezent în legătură cu diabetul zaharat. O recomandăm de aceea fără rezerve cercetătorilor, clinicienilor precum și tuturor celor doritori să se informeze detaliat asupra progreselor realizate în elucidarea diverselor aspecte ale acestei maladii complexe.

Tiberiu Trandaburu

Current Topics in Microbiology and Immunology, 74. W. Arber, W. Henle, P. H. Hofschneider, J. H. Humphrey, N. K. Jerne, P. Koldovský, H. Koprowski, O. Maaløe, R. Roth, H. G. Schweiger, M. Sela, L. Syruček, and P. K. Vogt, eds. Springer-Verlag Berlin. Heidelberg. New York 1976, 168 pp, 22 figures.

Volumul cuprinde treceri în revistă privind identitatea chimică și imunochimică a amiloidului (A. Rimon), represorul și modul său de acțiune (V. Pirrotta), aspecte moleculare ale replicării ADN în sistemele E. coli, acizii teichoici (R. Dziarski) și transcripția la adenovirusuri (P. A. Sharp & S. J. Flint).

Sînt descrise de fiecare dată modurile de acțiune și enzimele implicate; se acordă o deosebită importanță relațiilor metabolice și, unde este cazul, se subliniază legătura cu procesele imunologice.

În sfîrșit, sînt menționate metodele chimice de separare ale compușilor puși în discuție, precum și compoziția lor din punct de vedere chimic.

Se remarcă o privire critică a autorilor asupra aspectelor dezbătute, unele dintre ele fiind încă în discuție.

O vastă bibliografie reține atenția celor interesați.

Vl. Gheordunescu

Current Topics in Microbiology and Immunology. 73. W. Arber, W. Henle, P. H. Hofschneider, J. H. Humphrey, N. K. Jerne, P. Koldovský, H. Koprowski, O. Maaløe, R. Roth, H. G. Schweiger, M. Sela, L. Syruček & P. K. Vogt, eds. Springer-Verlag Berlin. Heidelberg. New York 1976, 219 pp, 22 figures.

Volumul de față reunește treceri în revistă și puncte de vedere în cîteva probleme de actualitate ale virologiei, în conexiune cu aspectele biochimice și imunologice.

Autorii se preocupă de virusul stomatitei veziculare — structura și funcția componentelor virionului (S. U. Emerson); integrarea genomurilor virusurilor ADN tumorale (popavavi-

rusuri, adenovirusuri și herpes (M. A. Martin & G. Khoury); replicarea ADN din popava- și adenovirusuri — infecție litică, structură, genetică, proprietăți de replicare, mecanisme, etc. (A. J. Levine et al.); translația in vitro a ARNm de adenovirusuri — sinteză de proteină, sisteme cell-free, genetică (H. Westphal) și se dezbate în final legătura între virusurile ARN tumorale și cancerul uman — biologie moleculară, antigenicitate, replicare, enzime implicate, asocierea cu cancerul uman, oncogeneza virală și originea acestor virusuri (R. Hehlmann).

Concentrînd în același volum sinteze și puncte de vedere ale unor autori reputați în domeniul virologiei și relației virus — cancer, cartea se înscrie ca o contribuție necesară și actuală în microbiologie și biochimie, folosind metodele moderne ale geneticii și imunologiei moderne.

Vl. Gheordunescu

Lipoprotein metabolism (Metabolismul lipoproteinelor), editat de Heiner Greten, Springer Verlag, 1976, 160 p., 72 fig.

Acest volum cuprinde lucrările simpozionului internațional de *Metabolismul lipoproteinelor*, organizat de Institutul de Cercetări cardiovasculare din Heidelberg, în septembrie 1975, cu scopul intensificării cooperării internaționale în domeniul aterosclerozei.

Deoarece unul din factorii de risc ai acestei boli multifactoriale este hiperlipoproteinemia, toate cercetările asupra metabolismului lipidelor și lipoproteinelor prezintă un interes deosebit. Acest fapt este reflectat și de programul simpozionului, în care secțiunile de *Enzime lipolitice*, *Interconversia și turnoverul lipoproteinelor plasmatice* și *Metabolismul intracelular al lipoproteinelor*, au fost în egală măsură reprezentate. O atenție specială a fost acordată metabolismului sitosterolului, ca și unor subiecte speciale, ca studii RMN ale lipozomilor sau asocierile intermoleculare în lipoproteine.

Participarea unor specialiști de renume mondial, actualitatea teoretică și practică a tematicii simpozionului, fac din acest volum un material deosebit de oportun pentru cei interesați.

Constanța Mușolan

MILTON H. SAIER, JR., CHARLES D. STILES, *Molecular dynamics in biological membranes* (Dinamica moleculară în membranele biologice), Heidelberg Science Library, Springer Verlag, 1975, 129 p.

Volumul de față cuprinde o serie de aspecte ale domeniului atît de intens cercetat în ultimii ani — membranele biologice.

Astfel, sînt discutate exo- și endocitoza, transportul substanțelor solubile prin membrane, receptarea chimică și energetică, reglarea metabolică. Sînt de asemenea abordate probleme deosebit de actuale, ca recunoașterea celulară sau rolul plasma-membranelor în reglarea creșterii și neoplazie.

Integritatea conceptuală a volumului este asigurată de ideea pe care autorii se străduiesc să o evidențieze în fiecare capitol, și anume indiferent de starea de evoluție a celulelor, procesele de membrană sînt esențial guvernate de aceleași principii, și înseși detaliile moleculare s-au conservat de-a lungul evoluției. Dacă acest principiu este lesne de verificat pentru unele aspecte ale dinamicii membranelor biologice, el rămîne încă de natură speculativă pentru altele.

Urmărind argumentarea acestui principiu, autorii au renunțat la descrierea în detaliu a părții experimentale, în favoarea evidențierii ideilor fundamentale ale cercetării moderne în domeniul biomembranelor. Fiecare capitol este însoțit de o listă bibliografică selectivă, de un material iconografic foarte sugestiv. Cartea are și un index de subiecte.

Acest volum, încă unul din seria numeroaselor apariții editoriale pe tema biomembranelor, este un material de studiu recomandat studenților și cercetătorilor din domenii diferite.

Constanța Mușolan

Bazele moleculare ale mișcării. (Molecular basis of motility)L.M.G. Heilmeyer, J. C. Ruegg, Th. Wieland eds. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York 1976, 215 p.

Prin publicarea referatelor generale prezentate la Simpozionul asupra mecanismelor moleculare ale mișcării ținut la Mosbach în 1975, cercetătorii contracției musculare au la înde-

mină un material valoros reprezentînd o sinteză a cunoştinţelor noastre în probleme referitoare la mecanismul transformării energiei chimice în energie mecanică sau la acţiunea Ca^{2+} şi reglarea ATP-azei actomiozinice. În cadrul simpozionului s-au discutat şi aspecte legate de alte structuri contractile, ex. microtubuli şi microfilamente. Sistemul contractil din plachetele sanguine, care au o morfologie simplă şi sînt uşor de izolat, tinde să devină un model experimental extrem de convenient pentru studiul molecular al mişcării în ţesutul nemuscular.

Lucrările simpozionului au demonstrat cu prisosinţă că numai prin efortul comun al unor domenii specializate, ca de ex. microscopia electronică, difracţia cu raze X, cinetică enzimatică, chimia proteinelor, se poate ajunge la alcătuirea unei imagini complete care să arate structura şi funcţia ţesutului muscular.

Ştefan Hulea
Institutul de ştiinţe biologice — Bucureşti

Testări de masă în cancerogeneza chimică (Screening tests in chemical carcinogenesis) R. Montesano, H. Bartsch, L. Tomatis eds. International Agency for Research on Cancer. Lyon, 1976 661 p.

Volumul de faţă cuprinde lucrările unei mese rotunde organizate de Agenţia internaţională pentru cercetări asupra cancerului în scopul coordinării eforturilor pentru protecţia omului contra efectelor nocive a mii de substanţe prezente în atmosferă datorită activităţii industriale sau de altă natură. Lucrările consfătuirii au tratat probleme legate de criteriile folosite în selectarea noxelor ce urmează să fie testate, metodele folosite în aceste testări şi valorificarea rezultatelor obţinute în urma diferitelor programe naţionale de catalogare şi testare a noxelor din mediul înconjurător.Participanţii la consfătuire au discutat de asemenea aspecte ale metabolizării carcinogenilor chimici, transformarea culturilor de celule *in vitro* şi metode de determinare a mutagenicităţii cît şi utilitatea studiilor privind leziunile induse ADN-ului şi căile de refacere a integrităţii moleculei pentru o mai bună înţelegere a mecanismului carcinogenezei. Una din concluziile importante ale mesei rotunde este că actualele teste de scurtă durată folosite la depistarea unei substanţe carcinogene pot contribui în mod hotărîtor la îmbunătăţirea unor criterii de selecţie a noxelor ce trebuiesc testate în termen lung pe animale de laborator. Prin valoarea şi actualitatea problemelor tratate volumul de faţă va fi bine primit de specialiştii din domeniul luptei împotriva cancerului.

Ştefan Hulea
Institutul de ştiinţe biologice — Bucureşti

Relaţii cantitative între structură şi activitate (Quantitative structure-activity relationships). Lucrările Conferinţei asupra interrelaţiei dintre structura chimică şi activitatea biologică. M. Tichy ed. Akadémiai Kiadó, Budapesta 1976, 265 p.

Deşi apărut cu o întîrziere de aproape 3 ani, prezentul volum nu îşi pierde caracterul de noutate datorită interesului din ce în ce mai mare acordat acestei ramuri relativ noi a biologiei, care este biologia cuantică. Cercetători de prestigiu din lumea întreagă şi-au dat întîlnire la Praga în iunie 1973 pentru a discuta aspecte legate de relaţia cantitativă dintre structura chimică a substanţelor naturale sau de sinteză şi activitatea lor biologică. Pe lîngă aspectul teoretic al problemei există şi un indiscutabil interes practic şi anume găsirea unor modalităţi practice de estimare cantitativă a caracteristicilor unei activităţi biologice declanşate de anumiţi compuşi activi cît şi de reducere a costului cercetării şi producerii unor astfel de compuşi. Spre deosebire de studiile calitative care se ocupă de găsirea grupării biologice active ale unei substanţe, lucrările prezentate la conferinţă reflectă preocuparea oamenilor de ştiinţă pentru găsirea acelor caracteristici care determină mărimea efectului biologic. Prevederea activităţii specifice a unui compus prin calcule teoretice pare să fie un domeniu abia la început şi cu perspective extrem de promiţătoare. Din lucrările conferinţei a reieşit limpede că prin combinarea metodelor fizico-chimice cu cele ale chimiei cuantice, ca de ex. metoda de calcul a orbitalilor moleculari, se vor putea, într-un viitor nu prea îndepărtat, prezice activităţile biologice ale unor compuşi farmacodinamici.

Ştefan Hulea
Institutul de ştiinţe biologice Bucureşti

„Studii și cercetări de biochimie" publică articole originale, de nivel științific superior, din toate domeniile biochimiei. Sumarele revistei sînt completate cu alte rubrici, ca: Viața științifică, în care prin note scurte sînt aduse la cunoștința cititorilor unele manifestări din domeniul biochimiei: congrese, simpozioane, consfătuiri, schimburi de experiență între cercetătorii români și cei străini etc., recenzii, în care sînt prezentate cele mai recente lucrări de specialitate apărute în țară și peste hotare.

NOTĂ CĂTRE AUTORI

Autorii sînt rugați să înainteze articolele, notele și recenziile dactilografiate la două rînduri. Tabelele vor fi dactilografiate pe pagini separate, iar diagramele vor fi executate în tuș, pe hîrtie de calc. Tabelele și ilustrațiile vor fi numerotate cu cifre arabe. Figurile din planșe vor fi numerotate în continuarea celor din text. Se va evita repetarea acelorași date în text, tabele și grafice. Explicația figurilor va fi dactilografiată pe pagină separată. Citarea bibliografiei în text se va face în ordinea numerelor. Numele autorilor va fi precedat de inițiale. Titlurile revistelor citate în bibliografie vor fi prescurtate conform uzanțelor internaționale.

Autorii au dreptul la un număr de 50 de extrase, gratuit.

Responsabilitatea asupra conținutului articolelor revine în exclusivitate autorilor.

Corespondența privind manuscrisele, schimbul de publicații etc., se va trimite pe adresa Comitetului de redacție: str. Docenților nr. 20, București 63, sectorul 1.

LUCRĂRI APĂRUTE ÎN EDITURA ACADEMIEI REPUBLICII SOCIALISTE ROMÂNIA

M. ŞERBAN şi D. COTARIU, **Biochimia contracţiei musculare**, 1970, 240 p., 20,50 lei.

L. DICULESCU, DOINA ONICESCU şi LETIŢIA MISCHIL, **Biologie celulară**, 1971, 420 p., 36 lei.

N. SĂLĂGEANU, **Fotosinteza**, 1972, 243 p., 5 pl., 13 lei.

V. D. MÎRZA şi H. ARAŢEI, **Biomorfologia corticalei ovariene la mamifere**, 1972, 180 p., 2 pl., 8 lei.

P. RAICU, M. IONESCU-VARO, G. GANCEVICI şi GABRIELA MOISESCU, **Celula. Structură, ultrastructură şi funcţii**, 1972, 344 p., 12 pl., 26 lei.

EUGEN MACOVSCHI, **Natura şi structura materiei vii**, 1972, 184 p., 4 pl., 15 lei.

EUGEN MACOVSCHI, **Natura şi structura materiei vii**, 1972, 184 p., 15 lei.

V. I. DEACIUC, **Reglarea celulară a metabolismului glucozei şi acizilor graşi**, 1973, 255 p., 10,50 lei.

CRISTOFOR SIMIONESCU, VIORICA RUSAN şi VALENTIN POPA, **Chimia algelor marine**, 1974, 212 p., 18 lei.

D. A. ABRAHAM, **Mecanismul de acţiune al hormonilor steroizi**, 1975, 184 p., 13 lei.

EMIL POP şi RADU CODREANU, **Istoria ştiinţelor în România-Biologia**, 1975, 287 pl., 13,50 lei.

ST. CERC. BIOCHIM., TOMUL 19, NR. 2, P. 129—228, BUCUREŞTI, IULIE—DECEMBRIE, 1976

1977 JAN 14

I. P. Informaţia — c. 1481

43 816

Lei. 20 —